G-SERIES 取扱説明書

Dr. GardnerはG-Series™の使用を推奨しています

Edition 7, January 2013

目次

はじめに

成功率を高めるには

Vitrolife社は、ヒト生殖補助医療における成功率向上に専心しています。長期間の生殖生理学分野での研究ならびに胚の発生に関する研究の結果、体外受精関連の最先端の培養液の商品化に成功しました。本書は、David K. Gardner博士によるVitrolife社製G-Series™の使用に際しての取扱説明書です。

生殖補助医療には様々な方法があります。今回、本書においてご紹介させていただく方法は、わが社の製品使用における高い成功率を収めてきた方法です。

Vitrolife社の体外受精関連製品

体外受精培養液

Vitrolife社は、安全かつ高率に受精する体外受精関連培養液製品を提供しています。製品はすべてのロットに対してマウス胚培養試験 (MEA) を含む厳密な品質管理試験を経てから、お客様にお届けしています。また販売されているすべてのロットには品質保証書が添付されています。

品質保証と品質管理 (ISO 13485:2003および21 CFR Part 820:QSR) によりロット間の均質性を保証しています。Vitrolife社の体外受精関連商品に使用される原材料はすべて、世界各国の市場で利用可能な最高品質のものを選抜しています。さらに、これらの原材料は、Vitrolife製品に使用される前に、個別に厳しい品質管理およびMEAによる試験を行い、基準を満たしていることが確認されたものです。

VitrolifeによるSwemed IVF器具

Vitrolife社では、吸引針、デニュデーションピペット、ICSIおよびバイオプシー用ピペット、胚移植用カテーテルなど、体外受精に関わる様々な器具類も取り扱っています。これらの器具類もまた、厳密な品質管理を経て、培養液と同様の品質基準に従って製造されています。

私達は、新しい人の命の「創造」には可能な限り最高の環境を受ける価値があると確信しています。私達はお客様に最高品質の製品をお届けするために、真剣に取り組んでいます。

概要

Vitrolife社製品を開梱する

Vitrolife社製品をお受け取りの際に、当社の製品が特殊な方法で包装されていることにお気づきになったと思います。それには特別な理由があります。

- すべてのVitrolife社製品は不正開封を防止するように封印されています。このような梱包方法では、証拠を残さずに容器を開けることはできません。
- 包装には毒性がない素材のみを使用しており、製品に影響を及ぼすことはありません。PETGボトル、スクリューキャップ、特製ラベル、そして薬学的なシーリングなどによって不正開封を防止しています。

G-IVF™ PLUSを除くG-Series™ PLUS培養液には5mg/mLのHSAが添加されています。また、G-IVF™ PLUSには10mg Mg/mLのHSAが添加されています。他のすべてのG5培養液はタンパク無添加であり (特別にラベル指定されていない限り)、ボトルのラベルの記載に従い、G-MM™ (ヒト組み換えアルブミン) あるいはHSA-solution™ (ヒト血清アルブミン) のどちらかを添加する必要があります。詳細は7ページの表を参照してください。

要点

- 製品を扱う前には手を洗い、消毒します。
- 血液、卵胞液、精液などの生体液を取り扱う場合は必ず必要な予防措置を取ります。

実践

1. 清潔な層流 (LAF) キャビネット内ですべての製品を開封します。
2. LAFキャビネットにボトルを持ち込む前に、ボトルの外側が清浄であることを確認します。エタノールを浸した、糸くずの出ないやわらかい布でボトルを拭くことを推奨します。
3. 製品ならびに使用期限を確認します。不正開封防止シールをはがして破棄します。

4 ボトルの栓を外し、滅菌されたペトリディッシュ内に栓を下向きに置きます。

5 滅菌済みの毒性のないピペットで必要量を取り出します。ボトルに栓をしっかりと閉めます。栓の内側には決して触れないでください。

6 培養液は可能な限り低温に保ちます。ボトルを冷蔵庫から取り出したらすぐにディッシュを用意します。ディッシュやチューブを用意するためにかかる時間以上に、培養液の入ったボトルを室温下に置かないでください。

無菌操作とは、感染あるいは雑菌の混入を起こしうる微生物が存在しない状態で操作することを意味します。

注意
一度開封されたボトルの口は無菌ではない可能性があるため、培養液等をボトルから直接注がないようにしてください。

CO_2による平衡

ヒトの胚の培養液の最適なpH値は7.2～7.4です。

正確なpHを測定するには、すべてのG-Series™培養液 (G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUS、G-PGD™、G-Freezekit Blast™およびG-Thawkit Blast™を除く) を6% CO_2の環境下で平衡します。これは一般的に海抜 0 mあたりに位置するラボに推奨されています。高地に位置するラボの場合、1,000 m につきCO_2濃度を約 0.6%ずつ上げるようにしてください。

正確な pH 値は常にpH値を実測することにより確認する必要があります。詳細は10ページを参照してください。

G-MM™またはHSA-solution™を添加する培養液

本取扱説明書では、「アルブミン添加」という単語が頻繁に使用されています。「アルブミン添加」とは、本項またはG-Series™ PLUS製品に関する項目で記載されているように、G-MM™あるいはHSA-solution™を添加することを意味します。

G-Series™ PLUS培養液、G-RINSE™、G-GAMETE™およびEmbryoGlue®にはアルブミンの添加は必要とされていません。

PLUSと指定されていないその他すべてのG-Series™の培養液はタンパク無添加で納品されるため、下表の表示に従って、G-MM™あるいはHSA-solution™を適切な濃度で添加する必要があります。

添加するタンパクを選ぶ際には、ヒト血清アルブミン (HSA) は血液製剤であり、未知あるいは未確認の病原因子等を含んでいる可能性があることを考慮してくださいそのため、HSAを使用する際はこういった感染物質に感染する危険性を完全に排除することはできません。組み換えヒトアルブミンを含むG-MM™はHSAの代替物質であり、製造過程において極めて微量 (0.15ppm以下) の酵母の抗原を含んでいる可能性があります。ですが、組み換えヒトアルブミンの製造過程において、動物あるいはヒト由来の原材料をまったく使用しないという製品の生合成の特徴から、ヒトあるいは動物に由来する感染物質が混入する可能性はまったくありません。

G-IVF™を除くG-Series™の培養液には、G-MM™あるいはHSA-solution™のどちらか一方を5%の濃度で加えます (9.5mLの培養液に対し0.5mLを添加)。G-MM™の最終濃度は2.5mg/mL、そしてHSAでは5mg/mLとなります。

G-IVF™には、G-MM™あるいはHSA-solution™のどちらか一方を10%の濃度で加えます (9.0mLの培養液に対し1.0mLを添加)。G-MM™の最終濃度は5mg/mL、HSAでは10mg/mLとなります。

アルブミンを添加した培養液を、滅菌済みの毒性のない組織培養グレードのチューブあるいはフラスコにいったん移します。使用するすべての容器は、特殊な物質あるいは毒性のある物質が容器内に残らないように、使用前にG-RINSE™で洗浄します。

G-MOPS™、G-1™、G-2™、G-PGD™へのアルブミン添加

培養液 [mL]	G-MM™あるいはHSA-solution™ [mL]	最終溶液量 [mL]
9.5	0.5	10.0
19.0	1.0	20.0
28.5	1.5	30.0
38.0	2.0	40.0
47.5	2.5	50.0
57.0	3.0	60.0
66.5	3.5	70.0
76.0	4.0	80.0
85.5	4.5	90.0
95.0	5.0	100.0

G-IVF™へのアルブミン添加

培養液 [mL]	G-MM™あるいはHSA-solution™ [mL]	最終溶液量 [mL]
9.0	1.0	10.0
18.0	2.0	20.0
27.0	3.0	30.0
36.0	4.0	40.0
45.0	5.0	50.0
54.0	6.0	60.0
63.0	7.5	70.0
72.0	8.0	80.0
81.0	9.0	90.0
90.0	10.0	100.0

G-FreezeKit Blast™およびG-ThawKit Blast™には以下のように添加します (50～52ページを参照してください)：

9.0 mL Freeze/Thaw solution + 1.0 mL G-MM™あるいは1.0mL HSA-solution™

凍結溶剤はディッシュに直接添加することもできます。それぞれの凍結溶液を900µLずつウェルに入れ、これにG-MM™100µLあるいはHSA-solution™100µLを添加します。

1 日で使い切る量を準備することをお薦めします。

G-MOPS™ またはG-MOPS™ PLUSの使用を推奨

G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSは、CO_2インキュベーターの外で配偶子および胚を操作する場合に使用する培養液です。

要点

CO_2インキュベーターの外で卵子および胚を操作する場合、不必要なストレスに晒さないようできる限り迅速に作業を行なうことが大切です。卵子および胚をディッシュ間で移動したり、ICSIを実施する際にディッシュの蓋が外されるため、しばらくすると温度や浸透圧と同様にpH値が変化する場合があります。これは、G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSを含むすべての培養液にあてはまります。

pH値の重要性

G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSはMOPS緩衝培養液で、37℃の空気環境下で使用しなければなりません。pHが指定範囲より低下するため、この培養液をCO_2環境では使用しないでください。また、G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSを覆う際に、CO_2環境で平衡したパラフィンオイルを使用してもいけません。

温度の重要性

卵子および胚は常に37℃に保ちます。

チューブまたはディッシュ内のG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSの温度が37℃であることを確認するために、ウォームブロック (チューブ) またはウォームプレート (ディッシュ) に置いた、G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSが入ったチューブまたはディッシュ内に認証温度計を入れて確認する方法を推奨します。これは、使用前にG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSが37℃であることを確認するためです。この目的を達成するために、個々のヒーティング器材を調整しておいてください。

浸透圧の重要性

浸透圧の変化を抑えるため、チューブにはできる限り大量の培養液を入れ、しっかりと栓をします。ディッシュは、使用しないときはオイルで覆うか、蓋をしておくようにします。

採卵のためのG-MOPS™

採卵に使用するG-MOPS™にはアルブミンを添加する必要はありません。使用前にG-MOPS™が37℃に温まっていることを確認するため、しっかりと栓をしたG-MOPS™のボトルを、CO_2を使用しない加温インキュベーターに入れて保温します。浸透圧変化を起こさないよう、ボトルにはしっかりと栓をしておきます。ボトルに入ったG-MOPS™の温度が37℃に達するまでには、4時間ほどかかることもあります。加温インキュベーターからボトルを取り出して使用する度に、しっかりと栓がされていることを確認してください。一度温められ、推奨時間内に使用されなかったG-MOPS™は必ず廃棄してください。推奨時間は、使用までしっかりと栓がされたチューブに保管されていた場合はその当日中、ディッシュ内の培養液の量が最低でも1mLあり、オイルで覆われていない場合は60分以内です。オイルで覆われたディッシュは、ウォームプレートが適切な温度が保たれていれば2時間まで使用可能です。

配偶子ならびに胚操作のためのG-MOPS™

配偶子ならびに胚操作のために使用するG-MOPS™にはアルブミンの添加が必要です。クリーンベンチ内で、滅菌済みの毒性のないチューブにG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSをピペットで移します。G-MOPS™を使用する場合は、適量のG-MM™あるいはHSA-solution™を添加します。浸透圧変化を起こさないように、チューブには最大限まで溶液を入れ、しっかりと栓をしておきます。CO 2を使用しない加温インキュベーター、あるいは適切な温度に調節されたウォームブロックにチューブを入れて加温します。使用前に温めておいた培養ディッシュに、加温したG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSをピペットで移します。浸透圧変化を避けるため、準備後は直ちに培養液を使用するようにします。ディッシュ内の培養液の量が最低でも1mLあり、オイルで覆われていない場合は60分以内に、オイルで覆われている場合は2時間以内に使用します。

CO_2を使用しない加温インキュベーター、あるいはウォームプレートに蓋をして置かれていた培養ディッシュに、温めておいたG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSをピペットで移します。浸透圧の変化を避けるため、オイルで覆うか、準備後60分以内にディッシュを使用します。これは、培養液量が1mL以上の場合に適用されます。培養ディッシュ内の温度が37℃であることを確認するため、ウォームプレートに置いたG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSが入ったディッシュ内に校正済みの温度計を入れて確認する方法を推奨しています。培養ディッシュ内の培養液の温度が37℃になるようウォームプレートの温度設定を調整する必要があります。

重要事項
G-MOPS™の入ったディッシュと培養液の入ったディッシュの間に洗浄ステップを導入することで、G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSが培養液に混入しないようにしてください。洗浄ステップは、1mLの培養液を各ステップに使用し、少なくとも2ステップ設けるようにします。洗浄用のディッシュは、卵子または胚5個ごとに交換します。

pH値の測定法

はじめに

ガラス膜電極と最新器具によるpH値測定方法が確実な方法です。しかし、最大の精密度を求められた場合、いくつかの注意点があります。特に、ガスあるいは高濃度のタンパクが溶解した溶液のpHを計測する場合は注意が必要です。

要点

- 基準電極内蔵で、温度測定機能を備えた準微小または微小電極を使用します。
- 自動温度補正機能を設定します。
- 測定した溶液のpHに近い新しい校正用緩衝液を少なくとも一つ使用します。毎回、校正用緩衝液を交換します。
- スロープおよびオフセットを毎日テストすることにより、電極の機能が適切であることを確認します。
- 電極が劣化し始めたら、すぐに交換します。pH電極が12ヶ月以上持つことは滅多に無く、大体2〜3ヶ月毎に交換しなければならないことが多いです。
- 電極は中性の緩衝液か、指定の保管液中で保管します。
- pH値の測定毎に装置を調整します。

実践 — 推奨されるpH値測定法

(実際の手順は使用する機器、測定するサンプルの性質により異なります)

1 電極を保存液から取り出し、洗浄後、pH 7.00の緩衝液に入れます。電極への空気吸入口をふさぐプラグまたはチューブを外します。

2 スタンドに取り付けた電極をpH 7.00 の緩衝液に 1 – 2 時間浸します。電極がpH 7.00の緩衝液に一晩保管されていた場合は、この時間を短縮することができます。

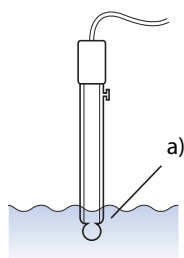
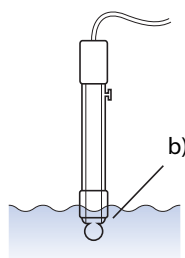
3 pH 7.00くらいの緩衝液と、例えばpH 10.0の2種類の新しい緩衝液で電極を校正します。

4 電極製造会社の規定制限内で電極のスロープ% (感度) とオフセット値 (繰り返し再現性) を確認します。スロープ%が理論値の95～102%であること、pH7.00のオフセット値が前回校正値と±4 mV以上解離していないことが推奨されます。

5 pH8.00くらいの緩衝液で校正されることを確認します。測定温度でのpHが分かっている緩衝液のpHを測定し、実測値と理論値を比較します。実測値は理論値との差が±0.05pH 以上にならないようにします。

6 測定するサンプルと同じ温度の蒸留水に電極を浸けます。

7 使用する温度ならびにガス濃度でサンプルを平衡します。CO_2の平衡には16 時間程度かかることもあります。

8 電極を蒸留水から取り出し、水分を取り除くために電極の先端をすばやく、柔らかい清潔なティッシュで拭きます。電極をすばやく平衡した培養液に入れます。平衡した培養液中に基準電極のガラス球と接触点を入れます。下図のa) およびb) を参照してください。

a) 焼却電極

b) スリーブ接続

9 pH値が安定したら、直ちにpH値を読み取ります。対象がCO_2で平衡した培養液の場合、培養液をインキュベーターから取り出してから30秒以内に測定を終えます。測定に30秒以上要した場合、CO_2は培養液から空気中に霧散し、培養液のpH値が上昇します。

10 予防措置としては、ある条件で既知のpHを持つ培養液も対照として、未知のサンプルと同様にpH値の測定を実施することができます。これにより、正確な測定が実施されたかを確認することができます。

11 適切な記録書あるいは業務日誌に、校正データを含むあらゆる測定値を記録します。

体外受精 (IVF) と培養系

IVFを行う際には、様々な培養方法があります。本取扱説明書では、当社の製品を使用して成功を収めてきた推奨される方法を記載しています。

要点

- その有効性、平易さそして再現性により培養系を選択します。
- 体系化し、事前に準備をしておきます。
- 胚培養のための品質管理がしやすく、毒性が無く、滅菌済みの使い捨て製品を使用し、実施されたあらゆる項目と手順の運用記録を残します。
- 一貫性を維持するためにプロトコルに従います。
- 機器類が正常に機能するかを確認し、常にチェックならびに校正を行います。
- あらゆる作業を清潔で専用の作業環境 (LAFキャビネット) で実施します。
- 無菌操作を行います。
- 培養液を扱うスタッフの資格審査を行い、継続的な教育プログラムを実施します。
- 生体液を取り扱うときは常に無毒性の手袋を着用します。
- 患者の識別を行い、作業前に各患者に使用するすべての器具機材に識別ラベルを貼ります。

精子の調整

IUI、IVFならびにICSIを実施する前に、運動精子を精しょう、死滅精子ならびに他の細胞から分離します。分離するためには様々な方法が利用できます。

どの精子調整法を使用するかは、精液所見だけでなく、患者の既往歴や前回の精液所見に基づいて決定します。また受精方法がIVFあるいはICSIになるのかも考慮します。IVF の場合は媒精に供するより多くの精子が必要となります。その場合の精子調整法には、生存しているものだけを選別するために精子の運動性に基づいて選別する方法、または成熟した精子のみを選別するために精子の比重に基づいて選別する方法があります。精子数ならびに運動能力が十分な場合、swim-up法が適当です精液性状が不良で、精子以外の細胞が多数含まれている場合は、密度勾配遠心法が好ましいでしょう原精液あたりの精子の回収効率はswim-up法に比べ、密度勾配遠心法の方が高くなっています。しかし、場合によってはswim-up法の方が密度勾配遠心法に比べて運動率が高いこともあります。

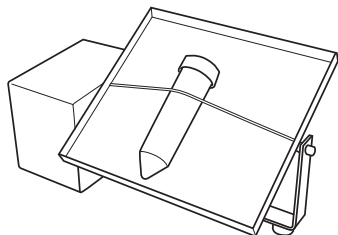
要点

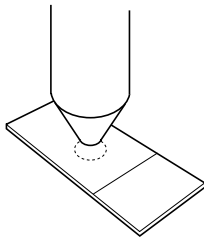
- 精子の調整は清浄な無菌の作業エリアで行います。精液サンプルを扱う間は無毒性のパウダーフリーの手袋と防護用眼鏡を使用します。
- すべての精液サンプルは、無菌性で無毒性の容器に回収します。調整前の1時間以内に精液サンプルを回収することを推奨します。精液サンプルは適切な温度で管理し、温度差を与えないようにします。
- 患者を綿密に識別するプロトコルも含め、ラボでのあらゆる作業手順に従います。
- 精子調整の前に滅菌された無毒性のチューブ、針そしてピペットをG-RINSE™ で洗浄します。

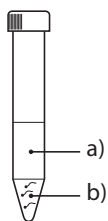
Swim-up 法 (migration)

実践

Swim-up 法は、精子数ならびに運動性が良好な精液サンプルに使用します。

1 精液を約20分間液状化させます精液が液状化しない場合には、23 ゲージ針または無菌の無毒性の細いパスツールピペット内に精液を出し入れさせて混和させます。

20分間液状化

2 最適な精子処理方法を確認するために、精液サンプルを顕微鏡で観察し評価します。

3 試験チューブに患者のIDをマークします。精液性状に懸案事項がある場合、複数のチューブを用意します。

4 洗浄済みのチューブにピペットで精液1.0mLを入れます。精液量に応じて、2〜4 本のチューブを準備します。平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUS 2.0 mLを慎重に重層します。チューブを37℃、6% CO_2環境のインキュベーター内に傾けて置き、30〜60 分間、swim-upします。

37℃、6% CO_2の環境下で30〜60間、swim-upします
a) G-IVF™またはG-IVF™ PLUS　b) 精液

5 下層の精液に触れずに上層の培養液だけを吸引し、清潔なチューブに移します。そこに、平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUS 5mLを加え、混和させてから300〜600gで10分間遠心します。

上層の培養液を取り、G-IVF™またはG-IVF™ PLUSで希釈し、遠心します。

6 上層の培養液を廃棄し、再び平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUS 5.0mLを加え、混和してから300〜600 gで10分間遠心します。

上層の培養液を廃棄し、再度洗浄します。

7 上層の培養液を廃棄し、すべての精子ペレットを1つにまとめます。精子の質に応じて、平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUS 0.5〜1.0mLで再懸濁します。

少量のG-IVF™またはG-IVF™ PLUSで再懸濁します

8 洗浄した精子の運動性ならびに濃度を測定します。

9 洗浄した精子を最終濃度が75,000–200,000運動精子/mL になるよう平衡したアルブミン添加 G-IVF™またはG-IVF™PLUSで希釈します。

10 洗浄済みの授精用ディッシュに0.5〜1.0mLの精子懸濁液を入れ、37℃、6 % CO_2の環境下で少なくとも2時間平衡します。

もう一つの方法: 既に卵子が入っているディッシュに平衡した精子を入れます。

オイルを覆う場合は少なくとも100µLのドロップで行うことを推奨しています。

密度勾配遠心法

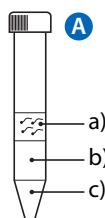
密度勾配遠心法は精液性状に関わらず、あらゆる精液サンプルに使用できます。

SpermGrad™ はシランコートされたコロイド状シリカ粒子を等浸透圧の等張塩類溶液に溶解したものです。様々な濃度のSpermGrad™使用することにより、異なった密度溶液を準備することができます。遠心管に注意深くこれらの異なった密度の溶液を重層することにより密度勾配を作ることができます。精子と異なった浮遊密度を持つ細胞やその他の微粒子は、より高濃度の密度層に達するまで沈降します。遠心することで精子とその他の細胞、微粒子との分離が加速します。通常は、SpermGrad™ 90%溶液と45%溶液を使用します。DNAが密集している成熟精子は90% SpermGrad™より高密度であるため、成熟精子は90%層を通り抜け、チューブの底に沈殿していきます。一方、未熟な精子や死滅精子を含む他の細胞は90%層あるいは45%層の表層に留まります。溶液を作製する場合は、すでに90% (下層) または45% (上層) に希釈されているSpermGrad™ RTUあるいはSpermGrad 100%保存溶液を使用することもできます。保存溶液を適切な濃度にするには、G-IVF™またはG-IVF™ PLUSを使用して希釈してください。G-IVF™には、G-MM™あるいはHSA-solution™のどちらか一方をアルブミン添加する必要があります。G-IVF™またはG-IVF™ PLUSは、使用前に37℃および6% CO_2に平衡しなければなりません。

実践

1　SpermGrad RTUを使用する場合は、段落 2 に進んでください。SpermGrad保存溶液を使用する場合：

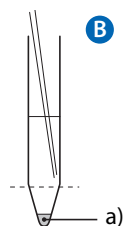
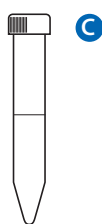
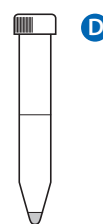
SpermGrad™にアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUSを加えて、90% と45%の溶液を作製します。90%の保存溶液の作製には、SpermGrad™ 9.0mLにアルブミン添加G-IVF™1.0mLを加えます。45%の保存溶液を作製するには、SpermGrad™ 4.5mLにアルブミン添加G-IVF™5.5mLを加えます。それぞれの溶液はよく混ぜて、滅菌済みの毒性の無いチューブまたは組織培養フラスコに保存します。ラベルを貼り、使用するまで冷蔵保存します。精子調整に必要な量を分注する場合、滅菌済みの無毒性のピペットを常に使用するようにします。保存溶液には日付を記載したラベルを貼り、推奨された期限 (ボトルの使用期限を参照する) を過ぎたら使用しないようにします。使用前に溶液を室温に温めます。

2　密度勾配は、患者のIDをマークし滅菌および洗浄済みの無毒性の円錐形遠心管2～4本 (精液サンプルの量により) で行ないます。最初にピペットで90%溶液1.5mLをチューブに入れ、その上にピペットで45%溶液1.5mLをゆっくりと入れます。最後に、精液1.0mLをそっと重層します (A)。密度勾配の入った遠心管を2-4本用意します。密度勾配の上層に重層する精液量は2mLまでにします。精液サンプルが正常の場合は、重層する精液量を減らすようにします。これは、重層する精液量が多すぎると、分離に失敗することがあるためです。

A. 密度勾配層と精液の入った円錐形遠心管。300～600gで20分間遠心します。
a) 精液　b) 45%　c) 90%

3 遠心管を300〜600gで10〜20分間遠心します。

4 上層 2 層を管壁に何も残らないように取り除きます (B)。アルブミン添加G-IVF™または G-IVF™ PLUSが5mL 入った滅菌、洗浄済みの円錐形チューブに可能な限り少量の90%溶液とともに精子ペレットを移します。

5 300〜600gで10分間遠心します。

6 上層を廃棄し、再度洗浄します (C)。2回目の洗浄後、精子ペレットを集め、平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUS 1mLに再懸濁します (D)。洗浄した精子の運動性な らびに濃度を測定します。

B. 上層を廃棄し、ペレットを清潔なチューブに移します。
a) 精子ペレット

C. G-IVF™またはG-IVF™ PLUSで精子ペレットを洗浄します。繰り返します。

D. 少量のG-IVF™またはG-IVF™ PLUSに精子ペレットを再懸濁します。

7 洗浄した精子を最終濃度が75,000–200,000運動精子/mLになるよう平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUSで希釈します。

8 洗浄済みの授精用ディッシュに0.5〜1.0mLの精子懸濁液を入れ、37℃、6% CO_2の環境下で少なくとも2時間平衡します。

もう一つの方法：既に卵子が入っている平衡したディッシュに平衡した精子を入れます。

0.5〜1.0mLの液量で、オイルで覆わずに授精することを推奨しています。オイルで覆う場合は、少なくとも100µLのドロップで行うことを推奨しています。

IVF-ET (体外受精と胚移植)

Vitrolife社では、胚発育の各ステージに適応した培養液を開発しています。G-IVF™またはG-IVF™ PLUSは体外受精に、G-1™またはG-1™ PLUSは分割期ならびに初期の胚に、G-2™またはG-2™ PLUSはday 3から胚盤胞期の胚に使用されるべき培養液です。ICSI後、胚はG-1™またはG-1™ PLUSに移します。胚の発育ステージに関わらず、胚はEmbryoGlue® またはアルブミン添加G2™あるいはG-2™ PLUSを使用して子宮に移植します。

卵胞吸引

採卵手順の目的は、可能な限り素早く多くの卵子を回収することであり、卵子が非生理的条件下に置かれるのを最小限にすることです。卵子に影響を及ぼす主要な因子は温度、浸透圧、そしてpHです。生理的条件から逸脱することにより、卵子が正常に受精する能力、正常に着床前の胚に発育する能力に悪影響を与える可能性があります。

要点

- 採卵日をDay 0とします。
- 作業開始前に患者の識別を行い、培養ディッシュとピペットのIDラベルをチェックします。
- 作業面が温まっていること、卵子が触れる可能性のある全ての器具類が滅菌済みで、毒性が無く、組織培養用であること、好ましくはマウス胚培養試験済みであることを確認します。
- 採卵は超音波モニターを使い、シングルルーメンあるいはダブルルーメン針を用いて行います。62ページのVitrolifeによるSwemed器具、採卵針V-Tip™の使用を推奨します。通常、圧力を調節できる吸引ポンプにより針の内腔に吸引圧がかけられます。
- 卵子にダメージを与える可能性があるので、高い吸引圧あるいは吸引圧を調節できないポンプを使用しないでください。

- 温めておいたG-MOPS™をすすぎ用に使用します。
- G-MOPS™はG-1™培養液をMOPSと重炭酸塩により緩衝して、室内環境でもpH値が正常域に保てるように調節されています。
- 吸引液の回収ならびに卵胞の還流に使用する温めたG-MOPS™は卵胞液のタンパク含量が高いことからタンパク無添加で使用することができます。
- アルブミンを添加したG-IVF™またはG-IVF™ PLUSで卵子を培養する前の洗浄には、アルブミンを添加して温めておいたG-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSを使用します。
- 37℃および6% CO_2で平衡したG-GAMETE™を、アルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSの代わりに使用することができます。
- 最高でも5個の卵胞に対して、1枚の洗浄ディッシュを用意することが賢明です。

実践

1. G-RINSE™を37℃および6% CO_2の環境下で平衡しておきます。
2. 卵子洗浄用の G-MOPS™ PLUS 温め、洗浄済みのチューブにピペットで移します。チューブにしっかりと栓をし、37℃ の CO_2を使用しないインキュベーターに入れます。
3. 卵胞還流用のアルブミン無添加のG-MOPS™を温め、洗浄済みのチューブにピペットで移します。チューブにしっかりと栓をし、37℃ の CO_2を使用しないインキュベーターに入れます。

   使用前に、培養液の温度が37℃であることを確認しておきます。
4. 吸引針の内腔とチューブをG-RINSE™で洗浄し、洗浄液を中に残さないようにします。
5. 個々に、あるいはまとめて卵胞を吸引します。洗浄済みかつ滅菌済みの無毒性の組織培養用のチューブに、吸引した卵胞液を回収します。血液を含んだ卵胞液の凝固を減らすために、品質テスト済みで医薬品用のヘパリン (2.5～10.0ユニット/mL) をG-MOPS™に添加します。
6. 滅菌済みで毒性が無く、組織培養用の使い捨てチューブに卵胞吸引液を回収し、すぐにラボで鏡検します。すぐに鏡検できない場合には、チューブをしっかりとシールして、37℃で保温しなければなりません。

卵子の回収

要点

- 無毒性の手袋を使用します。
- 作業前に患者を確認します。
- 温度が下がらないように素早く作業します。

実践

1. 卵胞吸入液は37℃に保ちます。顕微鏡の横に試験管用ヒートブロックを設置し使用すると温度管理が容易になります。卵胞吸引液を滅菌済み組織培養ペトリディッシュに入れ鏡検します。

2. 卵胞をフラッシュする場合には、37℃に温めたG-MOPS™を使います。

3. 卵胞吸入液を空のディッシュに移します。卵子を見つけたら、アルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSで中を事前に洗浄した滅菌ピペットで、血液が混入した可能性のある卵胞液からすぐに卵子を移します。

4. 温めたアルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSで卵子を洗浄し、次に平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUSで洗浄します。G-IVF™またはG-IVF™ PLUS の洗浄は1.0mLの培養液で2回以上行うようにします。平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUSの入ったディッシュに卵子を移し、素早く、インキュベーターにディッシュを戻します。

卵子の培養と受精

要点

- 配偶子の操作や受精には温度、pH値そして浸透圧に十分配慮します。
- 培養用の容器がインキュベーターの外に出ている時間、ならびに容器が置かれている面が温められているか、例えば加熱ステージ付きの顕微鏡が使用されているかどうかなどによって、温度低下は急速に起こります。
- 浸透圧変化は培養液の量、温度、そしてオイルで覆われているかどうかに左右されます。浸透圧は緩慢に変化するため、見落としやすいパラメータであります。培養系は、適切に湿度を保てるようオイルで培養液を覆う必要があります。
- pHの変化は温度低下と同様、急速に起こり、培養用の容器がインキュベーターの外に出ている時間、ならびに容器が空気に触れている時間に関連します。
- 作業面が温まっていること、卵子が触れる可能性のある全ての器具類が滅菌済みで、毒性が無く、組織培養用であること、好ましくはマウス胚培養試験済みであることを確認します。

体外受精

実践

1. 75,000–200,000 精子/mLの精子が入っている授精用ディッシュに卵子を移し、37℃、6% CO_2の環境下で一晩保管します。

   もう一つの方法：既に卵子が入っている平衡したディッシュに、平衡を行った精子懸濁液を入れます。

   同じディッシュ内で数個の卵子を授精します。オイルで覆う場合は、少なくとも100µLのドロップで行うことを推奨しています。

受精の評価

要点

- IVFで授精した卵子は、精子を卵子の入った培養液に導入後、約15–20時間 (day 1) に受精しているかを検査します。前核 (PN) の出現が早いことから、ICSI卵子は精子注入後12–18時間に検査します。
- 受精卵は温度、pH値の変化に敏感なため、温めたアルブミン添加G-MOPS™またはGMOPS™ PLUSをインキュベーター外での操作液として使用することにより、こういった変化を最小限にすることが重要です。
- G-MOPS™とG-MOPS™ PLUSは、室内環境で操作する間もpH値を安定させるようMOPS緩衝液を含んでいるため、使用前にCO_2環境下で平衡する必要はありません。むしろ、この培養液はCO_2環境外でpHを7.2〜7.4 に保つよう設計されています。
- G-GAMETE™はアルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSの代わりに使用できます。G-GAMETE™は使用前に37℃、6% CO_2環境下で平衡します。
- すべての顕微鏡のステージを温め、迅速に作業することが推奨されます。ディッシュ内の温度が適温であるかを確認するために、ステージならびにディッシュ内にしっかり固定できる熱電対の付いた認証温度計あるいは校正済みのデジタル温度計により測定します。

実践 — 受精の評価

1. 温めたアルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUS 入れたディッシュに卵子を移します。
2. 37℃で卵丘細胞除去用ピペット (62ページのVitrolifeによるSwemed器具を参照) を使い、卵丘細胞と放線冠細胞を卵子から外します。通常、卵丘細胞と放線冠細胞は精子から分泌されたヒアルロニダーゼにより分散します。卵丘細胞が良く分離していない場合は、針を使用

して注意深く卵子から放線冠細胞を剥がします。極体ならびに前核が観察できる程度に細胞を除去すれば十分です。

3 顕微鏡下で観察し、前核と極体の数、そしてある場合には卵核胞の存在を記録します。観察にはNomarski あるいはHoffman干渉装置の付いた倒立顕微鏡の最高倍率 (少なくとも200倍) を使用することを推奨します。倍率が低い場合、受精を正確に評価することが難しくなります。正常受精由来の胚 (2PN) のみが培養ならびに胚移植に使われるべきです。未受精卵、変性卵、1 PN卵、そして 3 個以上の多前核卵は培養から除きます。前核の分類は以下のページを参照してください。

4 受精の評価を終えた後、受精卵は平衡したアルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUSのドロップで数回、十分に洗浄し、平衡したアルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUSで培養します。この際には、オイル下で培養することが望まれます。

ヒト前核期胚の分類

Scott L、Alvero R、Leondires M と Miller B (2000) によると、ヒト前核期胚の形態は胚盤胞への発育ならびに着床に関連します (Hum Reprod 15, No 11, pp 2394-2403)。(Hum Reprod 15, No 11, pp 2394-2403)。

要点

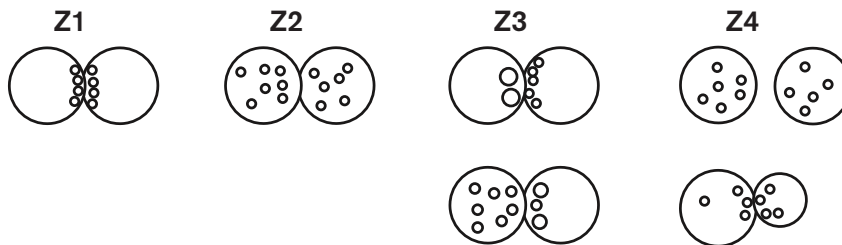
- 前核期胚の形態は胚盤胞の発育、着床ならびに妊娠に関連性があります。
- 分類法は前核期胚の発育能を評価するために使用され、2つの前核 (2PN) の形態に基づいています。
- 前核の評価はDay 3胚ならびに/あるいは胚盤胞期胚の評価に結び付けられます。
- 多胎妊娠の合併症を避けるため、移植する胚数は多くとも 2 個とすることを推奨します。

実践

- 生理的な pH値ならびに温度を保って、倒立顕微鏡下で前核期胚の評価を行います。
- IVFの場合は15-20時間後、ICSIの場合は12-18時間後に前核期胚の評価を行います。この時間差は、ICSI卵の場合、IVFに比べ前核の出現ならびに消失が早いことがその理由です。
- 前核期胚の評価には、アルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSあるいはG-GAMETE™を使用することを推奨します。

前核期胚の評価方法

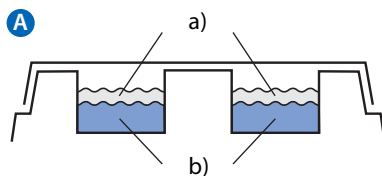
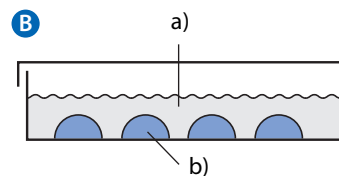
- 前核の大きさが均一であるもの。
- 核小体が前核期胚の接点側に一列に並んでいるもの
- 核小体の数が3から7個/核であり、前核間の核小体数の違いは、あっても1個以下のもの。
- 前核のサイズが同等のもの。
- 良好な着床率、妊娠率を得るためには、前核期にZ1スコアであり良好な形態の胚を、移植時に選択することが賢明です。

形態様式

培養法の選択

配偶子の培養と胚の培養には2通りの培養法があります。

A　　オイルで覆われたもの、または覆われていないチューブあるいはウェルで多量(0.5mL〜1.0mL) の培養液を使用する場合。

B　　B オイルで覆い、少量 (0.05〜0.1mL分のドロップ) の培養液を使用する場合。

オイルで覆わない場合、培養液の表面は数日間の培養により浸透圧が変化しても十分なサイズです。それゆえ、温度や浸透圧の変化を防ぐため、また空気中の微粒子や細菌の混入を防ぐためにオイルを使用することが推奨され、その粘性と純度の高さからパラフィンオイルが選択されています。OVOIL™は医薬品用のライトパラフィンオイルで、0.22μm ポアサイズの滅菌フィルターで滅菌されています。

A. OVOIL™で覆ったマルチウェル
a) OVOIL™
b) 培養液

B. オイルで覆ったドロップ
a) OVOIL™
b) 10〜100μLの培養液ドロップ

培養液の準備

6% CO_2ならびに5% O2環境下で胚の培養を行うことが理想的です。こういったガス環境は、マルチガスインキュベーター、あるいは混合ガス (6% CO_2、5% O2ならびに89% N2) が供給されるモジュール式のインキュベーターチャンバー/保育器で作製が可能です。低酸素培養を行うことは極めて重要ですが、低酸素培養が出来ない場合は6% CO_2環境を使用します。

実践

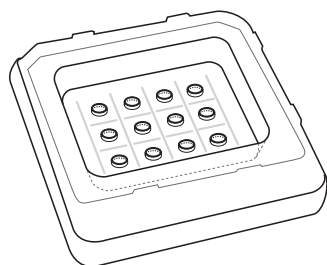
1 すべての培養器具類 (ウェルやチューブ) は使用前にG-RINSE™で洗浄しておきます。

2 採卵実施日の午後に、マイクロドロップディッシュに患者の IDをラベルします。洗浄済みの滅菌チップを使い、25µLまでのアルブミン添加 G-1™またはG-1™ PLUSでマイクロウェルを適切な数だけ作製します。蒸散を防ぐため、すぐにドロップをOVOILで覆います。一度に 2 枚以上のディッシュを作製しないようにします。

   もう一つの方法としては、40mmの培養ディッシュに患者のIDをラベルします。洗浄済みの滅菌チップを使い、50µLまでのアルブミン添加 G-1™またはG-1™ PLUSのドロップをディッシュの底に作製します。蒸散を防ぐため、すぐにドロップをOVOILで覆います。一度に 2 枚以上のディッシュを作製しないようにします。

   つぶれずに、高さを維持したドロップを作製するには、40mmの培養ディッシュに25µLのアルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUSのドロップを6 個作製します。蒸散を防ぐため、すぐにドロップをOVOILで覆います。ドロップごとに新しいチップを使用し、チップの洗浄後、前もって作製されていたドロップに25µLを加えるようにします。一度に 2 枚以上のディッシュを作製しないようにします。こうすることにより、ドロップが平らにつぶれることなく維持できます。

3 ディッシュをすぐに37℃、6% CO_2のインキュベーターに移します。ディッシュのフタを少しずらして斜めにしておきます。こうすることにより、確実に平衡できます。

ディッシュはフタを少しずらした状態で少なくとも6時間 (オイル下で培養液が適切なpH値になるのに必要な最低限の時間) から最長18時間、インキュベーター内で平衡します。

胚の培養

要点

- 胚を培養する場合は温度、pHそして浸透圧に特に気をつけます。
- 温度低下は、培養用の容器がインキュベーターの外に出ている時間に関連し、急速に起こります。ウォームプレート上で、例えば加熱ステージ付きの顕微鏡で操作することを推奨します。
- 浸透圧は緩慢に変化するため、見落としやすいパラメータです。培養系は、適切に湿度を保てるよう培養液をオイルで覆う必要があります。
- 空気にさらされている場合、培養液のpH変化は急激に起こります。培養ディッシュがインキュベーターの外に出ている時間を可能な限り短縮するようにします。
- 胚盤胞移植により、高い着床率と妊娠率に達することができます。
- 胚盤胞への培養とその移植により、day 2 / day 3 IVF-ETの欠陥が補われるわけではありません。
- 胚盤胞移植ならびに凍結のための培養にはラボのコンディションを厳密に管理する必要性があります。
- 胚盤胞への培養には十分な数のインキュベーターが必要となります。理想的には週に5件程度の採 卵が行われている場合は2台のインキュベーターを使用し、1 台のインキュベーターは胚の培養用に、もう 1 台は培養液の平衡用とします。インキュベーターの扉を開ける回数を最小限にするために、培養用のインキュベーターは培養液の平衡に使用しません。

実践：分割期胚の培養
Day 1 –G-1™またはG-1™ PLUSでの培養

1. 卵丘細胞を除去した後は、パスツールピペットを引いて細く加工したピペットによりすべての胚操作を行います。62ページのVitrolifeによるSwemed器具、移植ピペットを参照してください。先端の内径が胚の直径より若干大きめのピペットを使用することが重要です。胚にダメージを与えないために、ピペット先端の内径を胚の直径より小さくしないことが極めて重要です。例えば、day 1から3の胚を扱う場合、150～200µmの内径があれば十分です。適切なサイズのピペットを使うことにより、胚の移動に伴う培養液の持ち込み量を最小限にすることができます。通常、持ち込む量は1µL未満に抑える必要があります。培養液の持ち込み量を最小限にすることは培養を成功させる上での必須条件です。
2. 卵丘細胞を外し、受精の評価を終えた前核期胚は、センターウェルディッシュに移し、温めたアルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUS、あるいは平衡したG-GAMETE™で洗浄します。洗浄は、最小限の培養液量とともに胚を2-3回吸入したり排出したりし、胚をウェル内で周辺に移動させたりして行います。さらに、培養ディッシュの2個のドロップ内で続けて洗浄します。洗浄回数をさらに増やすことにより古い培養液を新しい培養液中に持ち込むリスクを

減らします。MOPS緩衝液が培養液中に混入するとpH値が本来あるべき値より低くなることもあります。

3 平衡したアルブミン添加G-1™あるいはG-1™ PLUSのドロップに胚を入れます。予防措置として、１０個を超える胚数の場合、２枚の培養ディッシュを用意します。胚を移したら、直ちにディッシュをインキュベーターに戻します。少なくとも２つのグループで培養することを推奨しています。例えば、６個の胚がある患者の場合、４個と２個あるいは５個と１個よりもむしろ３個と３個という２つのグループで培養することが理想的です。

4 day 3 に、胚を平衡したEmbryoGlue®、あるいは平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSとともに子宮に移植します。別の方法として、day 3に胚を平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSに移し、胚盤胞期まで培養する方法もあります。

実践：胚盤胞期胚の培養
Day 3 –G-2™またはG-2™ PLUSでの培養

1 day 3の朝、マイクロドロップディッシュに患者の IDをラベルします。洗浄済みの滅菌チップを使い、25µLまでのアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSでマイクロウェルを適切な数だけ作製します。蒸散を防ぐためにすぐにドロップをOVOILで覆います。一度に２枚以上のディッシュを作製しないようにします。すぐにディッシュを37℃、6% CO_2環境のインキュベーターに移します。使用前に少なくとも６時間平衡しておきます。１人の患者につき１０個以上の胚がある場合、ディッシュを２枚用意しておきます。

もう一つの方法としては、40mmの培養ディッシュに患者のIDをラベルします。洗浄済みの滅菌チップを使い、50µLまでのアルブミン添加 G-1™またはG-1™ PLUSのドロップを、ディッシュの底に作製します。蒸散を防ぐため、すぐにドロップをOVOILで覆います。一度に２枚以上のディッシュを作製しないようにします。

つぶれずに、高さを維持したドロップを作製するには、40mmの培養ディッシュに25µLのアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSのドロップを９個作製します。蒸散を防ぐため、すぐにドロップをOVOILで覆います。ドロップごとに新しいチップを使用し、チップの洗浄後、前もって作製されていたドロップに25µLを加えます。一度に２枚以上のディッシュを作製しないようにします。こうすることにより、ドロップが平らにつぶれずに維持できます。すぐにディッシュを37℃、6% CO_2環境のインキュベーターに移します。使用前に少なくとも６時間平衡しておきます。１人の患者につき１０個以上の胚がある場合、ディッシュを２枚用意しておきます。

別な方法として、胚盤胞期までの培養用ディッシュをday 2の午後に作製し、37℃、6% CO_2環境で一晩平衡しておくことも出来ます。

2 各患者に対して、胚１０個あたり、温めたアルブミン添加G-MOPS™ あるいはG-MOPS™ PLUS、または平衡したG-GAMETE™を入れた洗浄用ディッシュを1枚用意します。センターウェルディッシュのウェルにG-MOPS™、G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™を1mL入れます。外側のウェルに、G-MOPS™、G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™を2mL入れます。ディッシュをウォームプレート上に置き、保温しておきます。

3 各患者に対して、発育評価用のディッシュを用意します。センターウェルディッシュのウェルにG-MOPS™、G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™を1mL入れます。外側のウェルに、G-MOPS™、G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™を2mL入れます。ディッシュをウォームプレート上に置き、保温しておきます。

G-MOPS™は決してCO_2環境のインキュベーターに入れてはいけません。密閉した容器に入れ、CO_2なしのインキュベーターあるいはウォームブロックで温めるようにします。

4 day 3の午後に、午前中に発育評価を行った胚を平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSに移します胚はday 5の朝に胚移植のための形態評価を受けるまで、37℃、6% CO_2下のアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUS中で培養します。胚の発育に懸案事項がある場合は、看護師ならびに医師に連絡します。

5 胚を洗浄用ディッシュで洗浄します (このステップはG-1™またはG-1™ PLUS中のEDTAの混入を防ぐ上で必須です) 洗浄は、最小限の培養液量とともに胚を2-3回吸入したり排出したりし、胚をウェル内で周辺に移動させたりして行います。洗浄後、分類するディッシュに胚を移し、同じような胚でグループを作るようにします。培養ディッシュ内の平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSのドロップを使って洗浄し、その後、各培養ドロップに最高 5 個の胚を入れます。直ちにディッシュをCO_2インキュベーターに戻します。

6 day 4に、アルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSの入った培養ディッシュを 3 枚用意します。ディッシュを「Transfer (移植)」、「Freeze (凍結)」ならびに「Hold (保管)」(day 6までの培養用) に区分しラベルで表示します。ディッシュは37℃、6% CO_2環境下で一晩平衡します。使用前の平衡時間は6時間以上とします。

7 胚移植は平衡したEmbryoGlue®あるいは平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSを用いて行うようにします。移植用培養液が入ったディッシュは使用前に37℃、6% CO_2下で少なくとも6時間平衡します。

8 day 5に胚の評価を行い、一番良好な胚盤胞を 1 個または 2 個、移植用に選抜します。形態が良好な移植しない胚は凍結します。day 5 までに胚盤胞に発生しなかった胚は、平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSのドロップを新たに作製し、その中でさらに24 時間培養してday 6に発育の評価を行います。

9 移植用に選抜した胚盤胞はアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSに移し、37℃、6% CO_2下で10〜30 分ほど培養します。

胚の評価

要点

- 胚移植はday 2 (授精後40–48時間) あるいはday 3 (授精後66–74時間) またはday 5–6の胚盤胞期 (授精後120–144時間) に行います。

- 胚の形態評価は出来る限り移植する直前に行います。
- 初期の胚は割球数、割球の規則性、フラグメンテーションの存在ならびにその割合、割球の粒状性 (グラニュラリティ)、分割率で評価します。胚盤胞の評価は、次のページの「ヒト胚盤胞の評価基準」を参照してください。
- 移植用の胚はその発育ステージに関わらず、新しくい平衡したEmbryoGlue®または平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSに入れます。

ヒト胚盤胞の評価基準

参照文献：Gardner DK と Schoolcraft WB (1999) In-vitro culture of human blastocysts. in Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond 1999. eds. Jansen, R. and Mortimer, D. Parthenon Press, Carnforth, pp 378-388.

要点

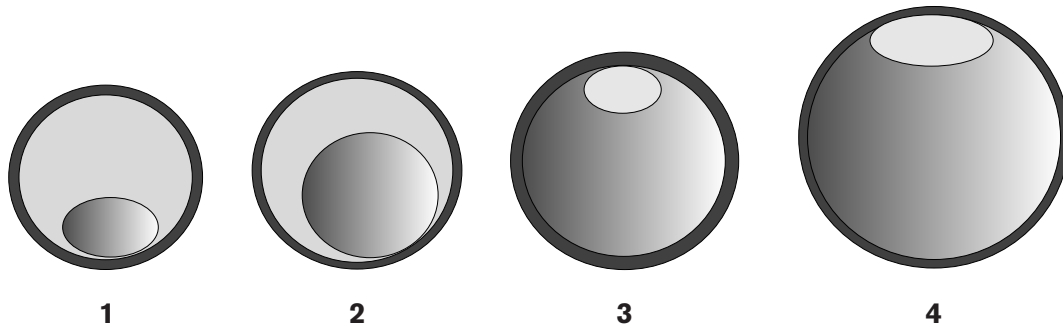
- 評価システムは形態に基づいて胚盤胞の発育能力を見積もるために使用され、それにより移植する胚あるいは凍結する胚の選別を可能とします。
- 胚盤胞の評価はpH値と温度を保ちながら、倒立顕微鏡下で行います。
- 胚盤胞に発育する胚のほとんどがday 5までに発育します (以下を参照)。
- 移植用に選択された胚盤胞 (2個まで) は「Transfe (移植)」とラベルされたディッシュに入れ、凍結用に選択された胚盤胞は「Freeze (凍結)」とラベルされたディッシュに入れます。
- 多胎妊娠の合併症を避けるため、移植する胚盤胞数は 1 つのみとすることを推奨します。グレード 3 以上の胚盤胞を移植する必要があります。その場合は、例えばAAなどの最も良いスコアリングを選びます。

実践

1. 胚盤胞は胞胚腔の拡張の程度とハッチングの程度に基づいて 1 から 6 の数字のスコア、そして内細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉の分類の英字 2 個をつけるようにします。
2. まず実体顕微鏡を使い、形態評価を行います。
3. 次に、倒立顕微鏡下で胚盤胞の評価を行います。グレード3から 6 の胚盤胞 (例えば後期胚盤胞以降の胚盤胞) では、ICMと外胚葉の発育評価も行います。

評価方法

胞胚腔の拡張の程度とハッチングの程度:

	1	2	3	4

1	初期胚盤胞	胞胚腔のサイズが胚の半分未満の胚
2	胚盤胞	胞胚腔のサイズが胚の半分以上の胚
3	後期胚盤胞	胞胚腔が胚の全体を占めている胚
4	拡張胚盤胞	胞胚腔のサイズが初期胚より大きく、透明帯が皮薄化している胚
5	孵化中胚盤胞	透明帯から栄養外胚葉細胞が孵化している胚
6	脱出胚盤胞	胚盤胞が完全に透明帯から脱出している胚

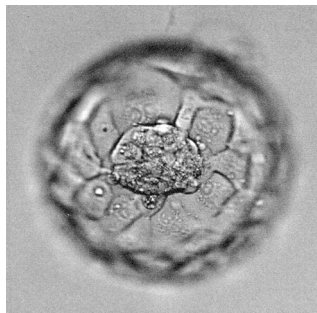
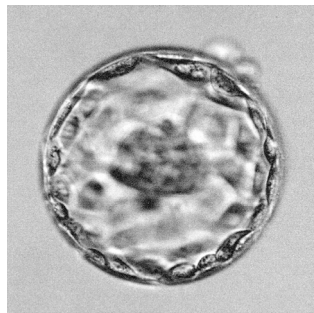
内細胞塊 (ICM) グレード:

A	多くの細胞が密に集合している
B	いくつかの細胞が疎らに集合している
C	細胞が非常に少ない

栄養外胚葉グレード:

A	多数の細胞が連続性を保っている
B	少数の細胞がわずかに連なっている
C	細胞が非常に少ない

4AAグレードの胚盤胞例

内細胞塊に焦点を合わせた画像

栄養外胚葉に焦点を合わせた画像

胚盤胞の形態評価表

胞胚腔の拡張/ 脱出の程度	内細胞塊			栄養外胚葉のグレード		
	多くの細胞が蜜に集合している **A**	いくつかの細胞が疎らに集合している **B**	細胞が非常に少ない **C**	多数の細胞が連続性を保っている **A**	少数の細胞がわずかに連なっている **B**	細胞が非常に少ない **C**
3 後期胚盤胞: 胞胚腔が胚の全体を占めている胚						
4 拡張胚盤胞: 胞胚腔のサイズが初期胚より大きく、透明帯が皮薄化している胚						
5 孵化中胚盤胞: 透明帯から栄養外胚葉細胞が孵化している胚						
6 脱出胚盤胞: 胚盤胞が完全に透明帯から脱出している胚						

胚盤胞培養のスケジュール (例)

胚盤胞培養のスケジュールは、胚移植のday 2またはday 3の場合と全く異なります。ここでは日々の作業概要を紹介します。

ラボスタッフ全員がこのページに目を通すように手配することを推奨します。

PLUS製品を使用する場合はアルブミンを添加する必要はありません。EmbryoGlue®、G-GAMETE™、G-RINSE™を除く、PLUS以外の製品にはG-MM™またはHSA-solution™を添加します。

Day –1	Day 0	Day 1
(採卵前日) 通常のIVFプロトコルとして、採卵ならびに授精用のG-RINSE™、G-MOPS™ そしてG-IVF™を準備する。ICSIの場合、G-1™ディッシュも準備する。G-GAMETE™を使用する場合、卵子洗浄用のディッシュを用意する。	G-IVF™を使って、採卵と授精を行う。ICSIの場合、精子注入後、すぐに卵子をG-1™に移す。Day 1に使用するために、午後の遅い時間帯にG-1™ディッシュを用意する採卵のためにG-MOPS™ディッシュを用意する。	IVFとICSIの受精を評価する。G-MOPS™またはG-GAMETE ™で洗浄し、G-1™で培養する。

day 2	Day 3	Day 4
発育観察をするか否かはラボの方針による。	胚の発育を観察する。午後の早い時間帯にG-MOPS™またはG-GAMETE™で胚を洗浄し、その後G-2™でよく洗浄後、培養する。	発育観察をするか否かはラボの方針による。午後の遅い時間帯に、胚移植用にEmbryoGlue®またはG-2™の入ったディッシュ、凍結用あるいはday 6までの培養用のG-2™の入ったディッシュを用意する。

Day 5	Day 6
胚盤胞への発育を観察する。胚移植用、凍結用そしてday 6までの培養用に評価基準を使用して胚の形態評価を行う。胚移植前に、胚盤胞をEmbryoGlue® または新鮮なG-2™に移す。	胚盤胞への発育を観察する。胚移植用または凍結用に評価基準を使用して胚の形態評価を行う。day 6で3BBに満たない胚盤胞は耐凍能力が低い。胚移植前に、胚盤胞をEmbryoGlue® または新鮮なG-2™に移す。

胚移植

胚移植 (ET) とは胚を子宮に移す過程のことです。通常は無麻酔で子宮頸管を介して移植を行います。

要点

- カテーテルを取り扱う際は、滅菌済みで無毒性のパウダーフリーの手袋を使用します。
- どのような場合にも、カテーテルチップが汚染しないよう最大限の注意を払います。
- 患者 1 人につき 1 または 2 個の胚を移植することが一般的な方法です。
- 多量の胚移植用培養液 (60µL) や大きな空気層は、子宮頸管内やカテーテルから胚を落としたりする原因となります。空気層を無くすことにより、こういった問題を低減することができます。1ccのエアタイトシリンジに取り付けたカテーテル内に、エア層を含まない平衡したEmbryoGlue®または平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUS約30µLの液層を作製することを推奨します。カテーテル開口部近くの移植用培養液の先端側に胚をロードします。

胚移植操作

婦人科医のための実践

1. 胚移植を行う患者には、前もって膀胱に尿を溜めておくよう伝えます。多くの場合、尿を溜めることにより、組織を傷つけない柔らかいカテーテルが子宮に挿入しやすい位置に移動します。後傾子宮の場合は、尿を溜めておかなくても構いません。
2. 毒性が無く、品質検査に合格し、使い捨ての、組織を傷つけないカテーテルを使用します。
3. 超音波誘導で胚移植をすることを推奨します。
4. 患者を砕石位にします。抗生物質入りの平衡したG-RINSE™で洗浄した膣鏡で子宮口を露出します。滅菌シリンジにより頸管粘液を除去する必要がある場合もあります。
5. ET時に (腹部から) 超音波走査することは、カテーテルの頸管通過を誘導する上で特に推奨されます。頸管通過の容易さを調べるためにトライアルカテーテルを使用しても構いません。頸管通過が容易な場合、胚を清潔なカテーテルにロードし、ETを実施します。トライアルカテーテルがいくつかの障害物に引っかかった場合、いくつかの選択肢を考慮します。ある程度の柔軟性を持ったオブチュレータを、カテーテルを頸管に導くために使用しても構いません。いずれにせよ、子宮口、頸管への外傷を最小限にするよう注意しなければなりません。

6 ET施術者はカテーテルを折り曲げたり、つまんだり、傷つけたりして、胚をカテーテルから出してしまわないよう気をつけます。

7 カテーテルは頸管を通過し、内口より内側に挿入します。ET施術者は感触的な手応えで内口より内側に挿入できたことが分かります。カテーテルは超音波モニター上でクリアに映し出されているので、どの程度の位置まで挿入されているか確認できます。超音波モニターでカテーテル の位置を確認します。

8 移植用培養液約30µL とともに胚を子宮内に排出し、シリンジのプランジャーの圧を保ちながら、カテーテルをゆっくり抜きます。

9 顕微鏡下でカテーテルに胚が残っていないか確認します。

本項の詳細な内容については、以下の文献を参照して下さい：Schoolcraft, Surrey and Gardner (2001) Embryo transfer: techniques and variables affecting success. Fertil.Steril.76; 863-870.

胚移植カテーテルへの胚のロード

ラボの実践

1 胚移植は平衡したEmbryoGlue®あるいは平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSを使用します。

2 洗浄済みのセンターウェルディッシュのウェルにEmbryoGlue® 約 1mLを入れます。

3 センターウェルディッシュの外側の溝にEmbryoGlue® 約2mLを入れます。

4 37℃、6% CO_2下で4〜18 時間平衡します。

5 EmbryoGlue®が入ったディッシュに胚を移し、6% CO_2下で胚移植前に**少なくとも10分**間培養します。胚はEmbryoGlue®で最長 4 時間まで培養することができます。胚を一晩EmbryoGlue®に入れたままにしてはいけません。

6 1mLの無毒性のシリンジ内をウェルディッシュのウェルの外側の溝に入れた培養液を出し入れし、気泡がシリンジ内に認められなくなるまで洗浄しますウェルディッシュのウェルの外側の溝に入れた培養液0.5 mLをシリンジに吸入します。

7 1mLの無毒性のシリンジに移植用カテーテルをしっかりと取り付けます。ウェルディッシュのウェルの外側の溝に入れた平衡した移植用培養液0.5〜1.0 mLをカテーテルに吸入、排出することにより、カテーテルを洗浄します。

8 洗浄後、EmbryoGlue® 0.1mLをセンターウェルから吸い上げ、シリンジ内の液量が20µL程度になるようにウェルディッシュのウェルの外側の溝に溶液を排出します。

9 顕微鏡下で、5〜10µLのEmbryoGlue® とともに胚をカテーテルにゆっくりロードし、その後、小さな空気層を作ります。(小さな空気層は超音波ガイドによる胚移植において、画像を明瞭にします)。胚移植を行う場合、頸管口から子宮内に約1cmカテーテル先端を進め、移植用培養液25–30µLとともに胚を子宮内に排出します。シリンジのプランジャーの圧を保ちながら、カテーテルをゆっくりと抜きます。顕微鏡下でカテーテルに胚が残っていないかを確認します。

マイクロマニピュレーション

マイクロマニュピレーションとはICSI (卵細胞質内精子注入法)、アシストハッチングそしてバイオプシーのことです。

要点

- すべてのマイクロマニュピレーション設備は安定性を最大限に確保するよう正確に配置します。ドア、エレベーターそして空気の流れによる振動、および動線から離れた場所に設置し、施術者にストレスを与えたり、騒音を引き起こすことを避けることを推奨します。
- ディッシュ内の培養液の温度が37℃に保てるよう調節したウォームプレートを倒立顕微鏡に備えつけます。マイクロマニュピレーション操作中は適切な温度を保つことが重要です。
- 平衡したオイルで覆ったドロップを使用することにより、浸透圧を調節します。
- 常に安定した成績を残し、品質管理を行うためにすべての操作において、高品質で無毒性のマイクロツールを使用します。62ページのVitrolifeによるSwemed器具を参照。

ICSIのための卵丘細胞の除去操作

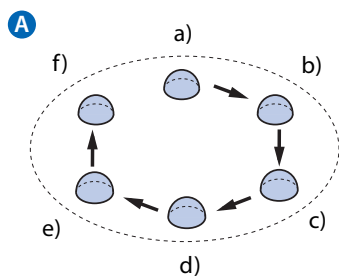
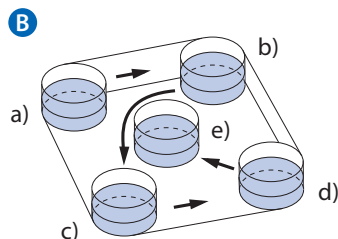
ICSIを行う場合、卵子の周りに付着している卵丘細胞と放線冠細胞を除去しなければなりません。この一連の操作を卵丘細胞の除去と呼んでいます。

この操作はマルチウェルあるいはディッシュに大量の培養液を入れ、オイルなしで行うことも、オイルで覆ったドロップ内で行うことも出来ます。

HYASE™ (ヒアルロニダーゼ) は卵丘細胞塊や放線冠細胞を分離するために使用されます。細いガラスピペット (卵丘細胞除去用ピペット、62ページのVitrolifeによるSwemed器具を参照) を使って、卵子をゆっくり吸入したり排出したりすることで細胞を除去しますピペットの内径は卵子の直径 (約130〜175µm) より少し大きめにします。グラスピペットを使用する場合は、内径のサイズが異なるものを複数用意しておきます。内径の小さいピペットあるいは先端がギザギザのピペットを使用すると卵子にダメージを与えることもあります。非生理的なpHや温度にさらすことと同様に、HYASE™に長時間さらして粗雑な操作をすることもまた、卵子にダメージを与えることになりかねません卵核胞期の卵子は特に敏感です。以上の理由により、適切な濃度のHYASE™を使用し、推奨される時間を守ることが大切です。HYASE™は10倍濃度となっているので、アルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUS、あるいはG-GAMETE™で10倍に希釈してください。

注意事項
HYASE™ に30秒以上さらすと卵子にダメージを与える可能性があります。

実践

1. HYASE™を添加 G-MOPS™ またはG-MOPS™ PLUS あるいはG-GAMETE™で希釈します。
2. 希釈したHYASE™の入った、洗浄済みの卵丘細胞除去用ディッシュとアルブミン添加G-MOPS™またはG-GAMETE™の入ったディッシュを用意します。
3. HYASE™入りのウェルそれぞれに対し、アルブミン添加 G-MOPS™、G-MOPS™ PLUS、あるいはG-GAMETE™ が1mL入った4つの洗浄用ウェルまたはオイルで覆った6個のドロップ (50〜100µL) を用意します (図A、B)。G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSを使用した場合は、37℃の大気下で約１５分間平衡します。G-GAMETE™を使用した場合は、正しいpH値に達するまで (一晩が望ましい)、6% CO_2環境下で平衡します。同時にICSI用ディッシュを用意します (下記の「実践-セットアップ」を参照)。

A. オイルで覆ったドロップ
a) HYASE™ 溶液　b –f) G-MOPS™G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™の入った洗浄用ドロップ

B. マルチウェルディッシュ。オイルカバーはしてもしなくてもかまいません
a) HYASE™ 溶液
b–e) アルブミン添加G-MOPS™、G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™の入った洗浄用ドロップ

4 大きめの内径のピペット (62ページのVitrolifeによるSwemed器具、移植ピペットを参照) により、3〜5個の卵子を希釈済みのHYASE™に入れます。ヒアルロニダーゼ中で卵子をゆっくりピペッティングします。すると間もなく、卵丘細胞がバラバラになり始めます。卵子をヒアルロニダーゼ溶液に30秒以上さらさないようにすることが重要です。

5 部分的に卵丘細胞を除去できた卵子を最初の洗浄液に移します。この際、ヒアルロニダーゼ溶液の持込を最小限度にするよう注意してください。細い内径の卵丘細胞除去用ピペット (62ページのVitrolifeによるSwemed器具、卵丘細胞除去用ピペットを参照) を使って、卵子を１個ずつ吸入したり排出したりして、放線冠細胞をはずすようにします。卵子を、温めたアルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUS、あるいは平衡したG-GAMETE™で洗浄します。他の卵子においても同様の操作を、新しいディッシュを使って繰り返し行います。

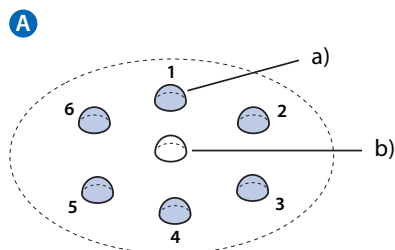
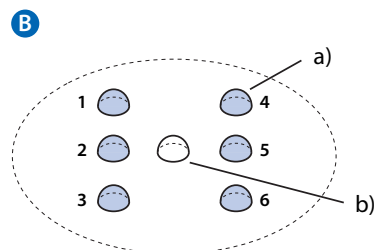
6 極体の存在 (ある場合はM2、無い場合はM1)、あるいは卵核胞 (GV) の存在の有無を調べることにより、卵子の成熟度を評価します。すぐにICSIが可能な場合は、事前に用意したICSI用ドロップにすべての成熟卵子を移します。ICSI前に卵子をしばらく培養する場合は、アルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUSに移し、ICSIを行うまで培養します。未成熟卵子 (M1とGV) は成熟するまで培養液内で培養することもあります。

実践 - セットアップ

1 アルブミン添加G-MOPS™またはG-MOPS™ PLUSとVOIL™を37℃で約15分温めるか、またはG-GAMETE™を37℃、6% CO_2環境で少なくとも4時間平衡します。

2 ICSI™ (粘性のある精子注入用溶液) を冷蔵庫から取り出し、20 ± 5℃に平衡します。

3 ICSI用のディッシュを速やかに準備します。ICSIディッシュの中央にICSI™ 1〜10µLのドロップ、アルブミン添加G-MOPS™、G-MOPS™ PLUSあるいはG-GAMETE™ 6〜10µLのドロ

ップを作製し、OVOIL™で覆います。ドロップからの蒸発を防ぐため、同時に2枚以上のディッシュを用意しないようにします。すばやく作業し、必要な器具は手元に準備しておきます (図A、B)。1人の患者につき2枚のディッシュを用意します。

A. オプション 1
a) 卵子用のドロップ、1〜6
(G-MOPS™/G-GAMETE™)
b) ICSI™

B. オプション 2
a) 卵子用のドロップ、
1〜6 (G-MOPS™/G-GAMETE™)
b) ICSI™

4 G-MOPS™を使用する場合、37℃で少なくとも15分間ディッシュを加温します。G-GAMETE™を使用する場合、37℃、6% CO_2の環境下で、少なくとも4時間平衡します。

ICSI の手順

ICSIとは精子を卵子内に注入することですICSIにより深刻な男性不妊を抱えたカップルでも妊娠が可能となります。

ICSIには通常、粘性のあるポリビニルピロリドン (PVP) が使用されています。PVPの使用により、精子の動きがゆっくりになるので、精子を容易に「捕まえる」ことができ、注入前の精子の不動化を正確に行え、尾部細胞膜に「傷をつける」ことができます精子注入時の注入速度を遅くし、精子注入を適切に行うことも可能にします。その結果、顕微注入操作を安定化させ、卵子中に注入されるPVP溶液量を最小にします。これらの要因がICSIの成功に大きく関わります。

要点

- インジェクションピペットで精子頸部のすぐ下を強くこすることにより、精子不動化を適切に行います (「crush tail」)。
- 精子を卵子細胞質奥 (卵子の直径50〜75 %あたり) に注入し、インジェクションピペットで精子が引きずり出されないようにします。

- 精子が囲卵腔に排出されないよう、少量の細胞質をゆっくり吸い上げることにより卵子細胞膜を破ることができます。
- 卵子に注入するICSI™ (PVP) を最小限にします。

ICSIならびにホールディングピペットに関しては、62ページのVitrolifeによるSwemed器具を参照してください。

実践

1. ICSI™のドロップの中央に少量の精子懸濁液 (1〜2µL) を添加します。ドロップの外側に精子が泳いで移動するようウォームプレート上で数分間ディッシュを温めます。
2. インジェクションピペット内に精子が張り付いてしまうリスクを軽減するために、ピペット内をICSI™で洗浄しておきます。
3. アルブミン添加G-MOPS™、G-MOPS™ PLUSまたはG-GAMETE™のドロップに卵丘細胞を除去した卵子を移します。ドロップあたり卵子１個とし、同時に処理する卵子数は４個までとします。
4. インジェクションピペットを使って、精子尾部細胞膜を破って精子を不動化します。細胞分裂の際に染色体の移動に関与している中心小体が精子頸部にあるので、精子頸部にダメージを与えないよう注意します。不動化が不十分な場合は、受精率の低下を招きます。不動化した精子を１個ずつ吸入します。
5. 卵子の入ったドロップを視野に移動させます。卵子を固定するためにホールディングピペットを使用します。極体の位置が１時か７時の位置になるように卵子を固定します。紡錘糸を傷つけるリスクを最小限にするため、４時の位置から精子を注入するようにし、精子とともに注入するICSI™を可能な限り少なくし、注入後は注入針からの液の流入を必ず停止させるようにします。ディッシュをインキュベーターの外に出しておく時間の長さに注意してください。ICSI 施術者が十分技術に熟練していない場合、または、ICSI困難症例の場合などは、ディッシュに入れる卵子数を少なくします。
6. 全てのICSI が終了した後、アルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUSでICSI卵を数回洗浄した後、平衡した G-1™培養液に移して一晩培養します。
7. 翌日、2前核 (PN) と2極体の存在により受精を判定することが出来ます。未受精卵、変性卵、3個以上の前核がある卵子、あるいは１前核の卵子は培養から外します。受精評価を行った後、受精卵は平衡したアルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUSで洗浄し、新しい平衡したアルブミン添加 G-1™ またはG-1™ PLUSを入れたディッシュに移して培養します。

ICSI困難症例

ICSI 症例の困難さは主に次の3つの因子によって決まります：

- ICSI 施術者
- 器具
- 精子

訓練、経験、忍耐力、そしてICSI施術者の能力が第一の因子を決定します。ICSIをセットアップする場合、時間と使用する機材に余裕を持つことが、特にICSI困難症例においては大変重要になります。また、機材は使用しやすく、精子を見つけにくい場合に施術者が集中して作業できるような安定したセッティングにします。人間工学に基づきデザインされたICSI作業環境設定により、よりスムーズに作業をすることが可能となり、長時間の作業が可能となります。
また、精子サンプルによってもICSIが困難になる場合もあります。例えば、奇形精子が多い深刻な症例と同様に、精巣生検により回収した精子懸濁液の場合、通常は精子数が少なく、運動精子が少なく、かつ細胞の残骸や他の細胞が混じっています。凍結融解した精巣上体精子もまた、困難な症例となりがちです。精子の生存率は低く、生存している精子でも前進運動性が極めて低かったり、全く運動性が無い場合もあります。
さらにICSI困難症例の3番目の例は、電気刺激により得られた精子です。この場合では精子数は非常に多いですが、運動性は低いことが多く、加えて、他の細胞や細胞片が混入しています。

精子数が少なく、運動性、前進運動性が低いケース

SpermGrad™ により精子を回収します (精子調整の項を参照)。平衡したアルブミン添加GIVF ™ またはG-IVF™ PLUSドロップに精子懸濁液を加えます。ICSI™に移します。

極めて精子数が低い場合、密度勾配による遠心処理を行わずに、精液サンプルを平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUSで10分間、300〜600g で遠心処理を行うことに注意してください。その後できる限り迅速に、平衡したアルブミン添加G-IVF™またはG-IVF™ PLUS 200〜500µLniを再懸濁します。

精巣生検

サンプル回収にはG-MOPS™ PLUSを使用します。精巣生検組織を滅菌済みの毒性の無いペトリディッシュに移し、小さく分散させます。

分散させた組織を小さな円錐形試験管に移し、5 分間、300〜600gで遠心します。上清を廃棄し、ペレットをG-MOPS™ PLUSに再懸濁します。2回目の洗浄が必要な場合もあります。

小さいペトリディッシュに精巣生検組織の再懸濁液5-10μLのドロップを作製し、OVOIL™で覆います。精巣精子を回収してG-MOPS™ PLUSのドロップに移し、精子の注入を行うまで入れておきます。

精巣生検組織の処理を翌日に行う場合は、アルブミン添加 G-IVF™またはG-IVF™ PLUS中に37°C、6% CO_2の環境下で培養します。

胚生検

胚生検とは、着床前期胚の遺伝子診断 (PGD) を行うために胚から割球を単離する作業のことです。

要点

- 通常、胚生検はコンパクションが開始する前のday 3の朝に実施します。
- 透明帯の切開は酸性タイロード、レーザー、あるいは透明帯切開法により実施します。
- 胚生検に使用するピペットは割球ごとに交換します。62ページのVitrolifeによるSwemed器具、バイオプシーピペットを参照します。

注意事項
G-PGD™はMOPS緩衝溶液です。G-MOPS™と同様に正確に扱わなければなりません(8ページを参照)。G-PGD™はCO_2環境のインキュベーターに入れずに、ウォームブロックあるいはCO_2なしのインキュベーターで保温してください。

実践

1 温めたアルブミン添加G-PGD™をOVOIL™で覆ったディッシュを用意します。

2 アルブミン添加G-PGD™のドロップで数回、胚を洗浄し、培養液の持込をなくすようにします。

3 37℃のG-PGD™ (Ca2+と Mg2+フリーのMOPS緩衝液) 中に胚を入れます。

4 胚をホールディングピペットで固定します。

5 透明帯に穴を開けます。その穴を通して清潔なバイオプシーピペットを挿入し、診断のため 1 または 2 個の割球を注意深く吸引します。

6 G-PGD™を持ち込まないようG-2™またはG-2™ PLUSでよく洗浄した後、平衡したアルブミン添加G-2™またはG-2™ PLUSに胚を移し、バイオプシー診断の結果が確定するまで培養します。正常と診断された胚をday 5に新鮮胚移植し、胚が余った場合は凍結します。胚移植は通常、遺伝子診断の結果が確定した後、day 5に行います。

注意事項

- **ホールディングピペットで胚の位置を調整する際に、核のある割球を明確に識別でき、単離できるように十分に時間をかけるようにします。**
- **既にコンパクションを起こしている場合、割球間に結合があり、割球を単離することがより難しくなりますそこで、割球を取り出しやすいように、時間をかけてピペットを動かすようにします。**
- **先端がギザギザになっているピペットを使用すると、単離する割球の細胞膜を破ってしまうことがあります。そのため、高品質のピペットのみを使用するようにします。**

胚の凍結保存

要点

- 凍結保存の成績はクリニックのIVFの成功率に基づいています。非凍結胚のIVFの成績が低い場合、それは凍結保存の成績にも反映されます。
- 凍結保存の成績は、良好に維持され正確に管理された凍結関連機器類、注意深い操作、そして形態的に良好な胚だけを凍結用に選ぶことに左右されます。

装置、機材のリスト

以下は推奨されるリストですので、別のものを使用することも可能です。

1. プログラムフリーザー：価格、設置する場所の広さ、そして機械のメンテナンスや購入後のサービスに基づいて購入する凍結機をお選びください。
2. 凍結タンク：タンクはヒトの胚専用に使用します。液体窒素中での保管が伝統的な方法です。感染症のある患者の胚を凍結する場合は別のタンクを使用してください。
3. 凍結用ストローまたはプラスティック製クライオバイアル：滅菌済で毒性が無く高品質のものを選択してください。
4. 使用する液体窒素 (LN_2) の量は、使用する凍結機器類と凍結保存システムにより異なります。

凍結保存とは細胞へのダメージを最低限に抑えた上で、凍結および融解することです。これは、細胞から水分を取り除き、凍結時の氷晶形成を抑える耐凍剤の使用により実現しています。細胞からの脱水を最大化するように凍結時の温度を適切に設定することにより、細胞へのダメージを最低限にすることが可能です。耐凍剤はその高浸透圧が細胞膜に及ぼすダメージならびに高濃度が細胞に及ぼす毒性のリスクを軽減するよう配慮して、使用します。

使用する耐凍剤は、凍結融解後の胚の発育によって選択します。通常、分割期胚にはプロパンジオールが、胚盤胞期胚にはグリセロールが使用されています。凍結胚が液体窒素中に保存されている場合、その保存中には細胞へのダメージは発生しません。凍結と融解のプロセスが、細胞の生存性には重要な要素となっています。

胚は耐凍剤溶液に浸漬後、ストローあるいはバイアルなどの容器に入れます。プログラムフリーザーは正確に決められた割合で容器の周りの温度を低下させます。耐凍剤溶液の凍結する温度で、液体窒素で冷却した鉗子で容器に触れることにより、氷晶を形成させます。このプロセスは植氷あるいは氷晶形成と呼ばれています。植氷を忘れたり不十分だったりした場合、脱水が不十分となり、その結果、細胞内で氷晶形成が起こり、細胞がダメージを受けます。細胞外に氷晶形成させることは、胚から適切に脱水を開始する上で重要なステップです。

細胞膜非透過の耐凍剤の細胞外の濃度が上昇ならびに胚外の水分が凍結するにつれて、細胞内水が細胞外に排出され、その結果、胚細胞が脱水されていきます。この工程は胚がその凝固点に到達するまで続きます。冷却速度が速すぎると、胚は十分に脱水されなくなります。

凍結保存胚を融解する速度が遅すぎると、融解過程で過冷却水が氷晶を形成し、細胞内の氷晶が細胞膜にダメージを与えることになります。通常、融解速度は使用した耐凍剤と –40℃以下での冷却速度とに関係しています。胚の凍結方法が急速凍結法、例えば–40℃まで急速に凍結した場合、融解は急速に、例えば30℃の温水に直接投入します (500℃/分)。反対に、ゆっくり凍結した、例えば、–80℃までゆっくり冷却した場合には、凍結チャンバー内で+10℃ /分程度の加温速度で融解しなければりません。グリセロールを使用した場合は急速融解を行います。

胚盤胞の凍結保存に関する詳細な情報は以下の文献に記載されています：

- Edgar DH, Karani J, Gook DA.Increasing dehydration of human cleavage-stage embryos prior to slow cooling significantly increases cryosurvival.Reprod Biomed Online.2009 Oct;19 (4):521-5
- Gardner DK, Maybach J, Lane M (2001) Hyaluronan and RHSA increase blastocyst cryosurvival.Proc 17th World Congress on Fertility and Sterility, Melbourne. pp 226
- Lane et al (2003) Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan.Mol Reprod Dev 64:70–78
- Gardner DK et al (2003) Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability.Fertil and Steril 79 (2):407–410

Freezekit™ CleaveおよびThawkit™ Cleaveを使用した分割期胚の凍結保存

この低温保存法は、卵母細胞、前核期胚から８細胞期胚にまで使用できる方法です。

凍結方法

FreezeKit™ Cleaveには前核期胚および分割期胚を凍結するための2種類の溶液が含まれています。ベースとなる溶液の組成は、MOPS緩衝液とヒト血清アルブミンです。

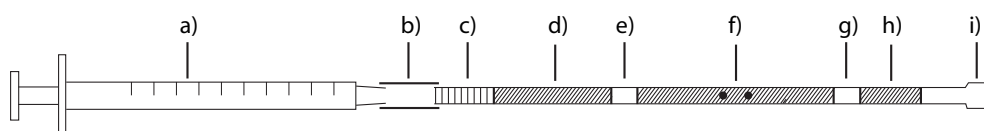
Equilibration solution = ES。耐凍剤なし

Freeze solution 1 = FS。耐凍剤としてプロパンジオール (1,2 propanediol: PrOH) およびシュクロースを細胞脱水に使用

要点

- 凍結融解後の胚の生存率は凍結前の胚の質に左右されるので、高品質胚のみを凍結します。
- 患者の識別を行い、凍結作業を開始する前に記録紙を用意します。

実践

1. 凍結溶液用ディッシュにラベルをはり、各ディッシュにESおよびFSをそれぞれピペットで適量 (0.5-1.0 ml) 入れ。
2. 室温に平衡します。希釈を避けるため、移動する胚に含まれる溶液を最小限にするようにします。
3. 凍結予定胚をESに入れ、洗浄します。胚はES内で10分間保持することができます。
4. 胚をFSに移し、10分間保持します。準備したストローへの胚の充填は、胚をFSに移動して直ちに開始することができます。胚のFS内保持時間が合計10分間になるようにします。生産メーカーの推奨どおり、あるいは下図を参照してストローを充填します。

a) シリンジ
b) プラスティックチューブ
c) 綿線仮封セメント
d) FS、2cm
e) 気泡 1/4cm
f) 胚の入ったFS 2〜3cm
g) 気泡 1/4cm
h) FS、1cm
i) シール部分：プラスティック栓

5　室温下で凍結チャンバーに装填し、凍結プログラムを開始します。

使用する凍結プログラム

凍結開始温度	18.0～25℃
Step 1	–6℃まで–2.0℃/分で冷却
Step 2	–6.0℃を保持し、２分後に植氷を行う–6.0℃を１０分間保持する胚近くに植氷しないこと
Step 3	–30℃まで–0.3℃/分で冷却
Step 4	–150℃まで–50℃/分～で冷却

ストローを取り出し、液体窒素中に投入します。-196℃で、液体窒素 (液体窒素の気相ではなく) 中で保管します。

融解方法

ThawKit™ Cleaveには前核期胚および分割期胚を融解するための3種類の溶液が含まれています。ベースとなる溶液の組成は、MOPS緩衝液とヒト血清アルブミンです。

Thawing solution 1 (TS1) およびThawing solution 2 (TS2) は、低濃度のシュクロースを含んだ緩衝液で、プロパンジオール (1,2 propanediol) を取り除き、徐々に細胞を再水和します。

Equilibration solution (ES) は耐凍剤を含まない緩衝液で、培養前の最後の再水和ステップに使用します。

要点

- ストローを1本ずつ融解します。
- すべての作業工程を室温で行います。
- 患者の識別を行い、凍結作業を開始する前に記録紙を用意します。

実践

1 融解液用のディッシュにラベルし、適切な量 (0.5～1.0ml) のTS1、TS2、ESをピペットでそれぞれに入れます。室温に平衡します。希釈を避けるため、移動する胚に含まれる溶液を最小限にするようにします。

2 ストローを液体窒素から取り出し、空気中で30秒間保持します。

3 ストローを30℃の水中に入れ、45秒間保持します。

4 ストローを取り出し、注意深く水分を拭き取ります。無菌操作でストローを開き、慎重に胚を排出します。TS1中に胚を5分間保持します。

5 胚をTS2中に移し、5分間保持します。

6 胚をES中に移し、5分間保持します。

7 平衡した培養液に胚を移し、洗浄した後、ラボの規格手順に従って培養します。

Freezekit™ 1およびThawkit™ 1を使用した分割期胚の凍結保存

この低温保法は、卵割段階胚から8細胞期胚にまで使用できる方法です。

この方法は、透過型耐凍剤としてプロパンジオール (1,2 propanediol: PrOH) を使用するTestart et al (1986) の方法を改変したものですシュクロースも細胞膜非透過型の耐凍剤として使用されています。シュクロースは浸透圧差を利用して冷却時の脱水を促進する高分子で、融解時の細胞膜保護物質として機能しています。操作を室温下のインキュベーター外で行えるよう、リン酸緩衝溶液が使用されています。

FREEZE-KIT1™

Cryo-PBS
= 25mg/mL ヒト血清アルブミン (HSA) を添加したリン酸緩衝溶液

Freeze solution 1 = FS1
= 1.5M PrOH添加Cryo-PBS

Freeze solution 2 = FS2
=1.5M PrOHならびに0.1M シュクロース添加Cryo-PBS

分割期胚凍結プログラム例

耐凍剤との平衡を含む凍結にかかる時間は約2時間です。

凍結開始温度	18.0～25℃
Step 1	–7.0℃を10分間保持し、2分後に植氷を行う
Step 2	–7.0℃10分間保持し、2分後に植氷を行う
Step 3	–30.0℃まで–0.3℃/分で冷却
Step 4	–30.0℃から–80.0℃未満まで–30.0℃で冷却 (少なくとも10℃/分)

ストローを凍結機から外し、液体窒素に投入します。液体窒素中 (液体窒素気相中ではなく) で保管するようにします。

要点

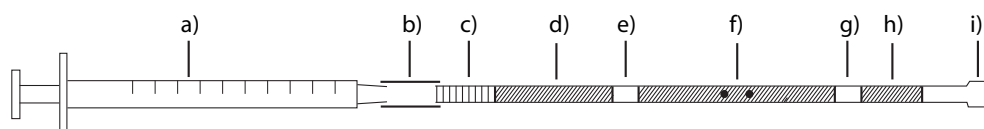
- 凍結融解後の胚の生存率は凍結前の胚の質に左右されるので、高品質胚のみを凍結します。
- 患者の識別を行い、凍結作業を開始する前に記録紙を用意します。

実践

1 凍結溶液用ディッシュにラベルを貼り、各ディッシュにCryo-PBS、FS1ならびにFS2をピペットで滴下し、室温に平衡します。

2 胚の形態を詳細に観察し、記録します。凍結予定胚をCryo-PBSで洗浄します。

3 胚をFS1に移し、10分間保持します (決して20分を超えないようにしてください)。このステップで胚の細胞は収縮し、その後回復します。

4 胚をFS2に移し、1mLシリンジに取り付けたストローに充填します (シリンジは1cm のシラスティックチューブを使って、ストローに取り付けます)。液体窒素がストロー内に浸入しないようストローを取り出して封印します。

a) シリンジ
b) プラスティックチューブ
c) 綿線仮封セメント
d) FS2、2cm
e) 気泡 1/4cm
f) 胚の入ったFS2、2～3cm
g) 気泡 1/4cm
h) FS2、1cm
i) シール部分：プラスティック栓

5 室温下で凍結チャンバーに装填し、凍結プログラムを開始します。

6 –7℃で、ストローの綿栓近くを液体窒素 (LN_2) で冷却した鉗子を使ってはさむことにより植氷します。
肧の近くで植氷をしないようにします。また、ストローを落としたり、振ったりしないでください。ストロー内に気泡がある場合、肧の生存率を低下させることがあります。凍結プログラムを継続します。

7 凍結には2時間ほどかかります。ストローは壊れやすいので、低温化での取り扱いは慎重に行います。その後、液体窒素中にストローを投入し、–196℃で保管します。

分割期肧の融解プログラム

THAW-KIT 1™

Thaw solution 1 = TS1
= 1.0M PrOHならびに0.2Mシュクロースを添加したCryo-PBS

Thaw solution 2 = TS2
= 0.5M PrOHならびに0.2Mシュクロースを添加したCryo-PBS

Thaw solution 3 = TS3
= 0.2Mシュクロースを添加したCryo-PBS

要点

- ストローを1本ずつ融解します。
- すべての作業工程を室温で行います。
- 患者の識別を行い、凍結作業を開始する前に記録紙を用意します。

実践

1 患者の識別とストローの位置を確認します記録紙を用意しておきます。融解作業を開始するまで、小さなデュワー缶の液体窒素 (LN_2) 中にストローを入れておくようにします。融解液用のディッシュにラベルし、適切な量のTS1、TS2、TS3ならびにCryo-PBSをピペットで滴下します。

2 ストローを液体窒素から取り出し、空気中で30秒間保持します。この間、ストローを注意深く取り扱い、気泡、シール内のクラックならびに液体窒素 (LN_2) の混入状態を調べます。

3 ストローを30℃の水中に入れ、30秒間保持します。ストローを取り出し、注意深く水分を拭き取ります。ストローの綿栓部を清潔なハサミで切り、1mLシリンジに取り付けます。ストローの反対側の端を注意深く切り、ストローを振ったり、気泡を作ったりしないようにします。

4 TS1中に慎重に胚を排出します。胚がストローから出てくるのを観察します。胚の存在が確認できない場合には、すばやくストロー内にTS1を入れ、慎重に還流します。これは時として胚がストローの内側に張り付いていることがあるからです。

5 TS1中で胚を5分間培養します。

6 胚を慎重にTS2中に移し、(約) 5分間保持します。凍結融解胚は浸透圧的にストレスを受けているため、胚を特に注意深く扱うよう注意してください。

7 胚をTS3中に移し、5〜10分間保持します。胚はストレスを受けており、細胞膜は脆弱です。

8 胚をCryo-PBS中で、室温下で6分間保持し、その後ウォームプレート上で、37℃で4分間保持します。Cryo-PB の緩衝能力は5% CO_2の環境下では十分機能しないので、CO_2インキュベーターには入れないようにします。

9 平衡したアルブミン添加G-1™またはG-1™ PLUS (あるいは胚をday 3で凍結した場合はG-2™またはG-2™ PLUS) に胚を移します胚の凍結融解後の生存性と形態を評価、記録し、凍結前の形態記録と比較します。胚はすぐに移植するか、培養するようにします。前核期胚はG-1™またはG-1™ PLUSで一晩培養し、正常に分割した場合のみ胚移植を行います。

10 凍結融解周期は凍結融解胚移植の成否に大きく影響を与えます。胚移植が適切な日に行えるよう確認することが大切です。胚は自然周期あるいはホルモン補充周期で移植します。

胚盤胞期胚の凍結保存

G-FreezeKit Blast™

50mg/mL G-MM™または100mg/mL HSA-solution™のどちらかを添加します：

Blastocyst incubation medium (BIM)
＝9.0mL BIM + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

Blastocyst freezing solution 1 (BFS 1)
＝9.0mL BFS 1 + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

Blastocyst freezing solution 2 (BFS 2)
＝9.0mL BFS 2 + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

BIMは、シュクロースとグリセロールを含まない修正MOPS緩衝G-2™培養液がベースになっています。シュクロースとグリセロールを含みません。

BFS1は100mMのシュクロースと 5%のグリセロールを含んでいます。

BFS2は200mMのシュクロースと 10%のグリセロールを含んでいます。

胚盤胞期胚の凍結プログラム例

凍結開始温度	–6℃
Step 1	2分後に植氷を行います
Step 2	10分間保持します
Step 3	–32℃ まで0.5℃/分で冷却します

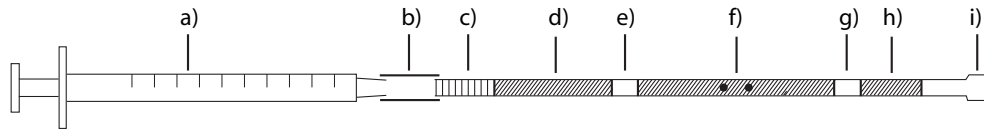
ストローを取り出し、液体窒素中に投入します。液体窒素中 (液体窒素の気相ではなく) で保管します。

要点

- 凍結融解後の生存率は凍結前の胚の質に左右されるので、高品質な胚盤胞 (≥ 3BB) のみ凍結します。
- 患者の識別を行い、凍結作業を開始する前に記録紙を用意します。

実践

1. BIM、BFS 1ならびにBFS 2 用のディッシュにラベルします。BIM、BFS 1、BFS 2を800µLずつ各ディッシュに入れます。20 ± 5℃に平衡します。
2. 胚の形態を詳細に観察し、記録します。凍結する胚盤胞をBIMで洗浄します。
3. 胚をBFS 1に慎重に移し、10分間保持します。
4. 胚をBFS 2に移し、7分間保持します。
5. 胚を移す際は、培養液の持ちこみ量は最小限にするようにします。
6. この7分間の間に、凍結用ストローを別のディッシュまたはウェルに入っているBFS 2で洗浄します。
7. 7分後、胚盤胞をストロー充填用の新しいBFS 2が入ったウェルに移します。

8 胚盤胞を1mLシリンジに取り付けた洗浄済みのストローに充填します (シリンジは1cm のシラスティックチューブを使って、ストローに取り付けます)。液体窒素がストロー内に浸入しないようストローを取り出して封印します。
15分以内でBFS 2での処理を終えます

a) シリンジ
b) プラスティックチューブ
c) 綿線仮封セメント
d) BFS2、2cm
e) 気泡 1/4cm
f) 胚の入ったBFS2、2〜3cm
g) 気泡 1/4cm
h) BFS2、1cm
i) シール部分：プラスティック栓

9 直ちに−6℃の凍結チャンバーに移します。

10 2分間待ちます。

11 −6℃で、ストローの綿栓近くを液体窒素 (LN_2) で冷却した鉗子を使ってはさむことにより植氷します。胚の近くで植氷をしないようにします。また、ストローを落としたり、振ったりしないようにします。これはストロー内に気泡がある場合、生存率を低下させることがあるからです。さらに10分間、−6℃で保ち、凍結プログラムを開始します。

12 凍結には50分ほどかかります。ストローは融解しやすいので、低温化での取り扱いは慎重に行います。その後、液体窒素中にストローを投入し、−196℃で保管します。

胚盤胞期胚の融解プログラム

G-ThawKit Blast™

50mg/mL G-MM™または100mg/mL HSA-solution™のどちらかを添加します：

Blastocyst thaw solution 1 (BTS 1)
＝9.0mL BTS 1 + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

Blastocyst thaw solution 2 (BTS 2)
＝9.0mL BTS 2 + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

Blastocyst thaw solution 3 (BTS 3)
＝9.0mL BTS 3 + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

Blastocyst incubation medium (BIM)
＝9.0mL BIM + 1.0mL G-MM™または1.0mL HSA-solution™

BTS1は200mMのシュクロースと 10%のグリセロールを含みます。

BTS2は100mMのシュクロースと 5%のグリセロールを含みます。

BTS3は100mMのシュクロースを含んでいます

BIMは、シュクロースとグリセロールを含まない修正MOPS緩衝G-2™培養液がベースになっています。シュクロースとグリセロールを含みません。

実践

すべての作業工程を室温下で行うようにします。

1 BIM、BTS 1、BTS 2 そしてBTS 3用のディッシュにラベルします。各ディッシュまたはウェルにBIM、BTS 1、BTS 2 そしてBTS 3を800µLずつピペットで滴下します。20 ± 5℃に平衡します。

2 凍結用デュワー缶に液体窒素 (LN_2) を入れ、凍結保存用タンクから凍結ケーンをすばやくデュワー缶の液体窒素中に移します。

3 鉗子を使ってストローをケーンから取り出し、10秒間、空気中に保持します。

4 ストローを30℃の水中に入れ、30秒間保持します。

5 ストローをウォーターバスから取り出し、水滴をきれいに拭い取ります。ストローの綿栓部を切り、切り口を1mLシリンジに装着します。ストローを装着したシリンジを使って、胚を排出します。

6 ストローの反対側の端を切り、切り口をBTS 1中に挿入します顕微鏡下でシリンジを使い、胚をBTS 1中に排出させます。残った溶液をディッシュカバーに排出し、BTS 1中に胚が見つからなかった場合にディッシュカバー上の溶液中から胚を検索するようにします。**ウォーターバスからストローを取り出し、ストロー内の溶液をBTS 1中に排出するまでに要する時間は最小限にします (1分未満)。同時に融解するストローは 1 本とします。**

7 胚より若干大きめの内径に加工したピペットを使って、胚をBTS 2中に直ちに移し、5分間保持します。溶液の持ちこみ量は最小にします。

8 胚をBTS 3中に移し、5分間保持します。

9 胚をBIM中に移し、5分間保持します。

10 胚を加熱ステージで37℃に加温しておいたBIMに移し、5分間保持します。

11 胚を 1 ウェルディッシュ中のウェルの平衡したアルブミン添加G-2™ またはG-2™ PLUS 1mLにいったん移して洗浄し、培養します。

12 平衡したEmbryoGlue®、あるいは平衡したアルブミン添加G-2™ またはG-2™ PLUSとともに子宮内に胚移植をします。

品質管理プログラム

Vitrolife社の製品に使用されている全ての原材料は医薬品用であり、該当品には米国薬局法 (US Pharmacopeia, USP) ならびにヨーロッパ薬局法 (European Pharmacopoeia, Ph Eur) が適用されています。原料の各ロットならびに最終製品は厳密な品質管理方法により試験され、評価されたものです。全ての製品は、厳密に制御および管理された環境の無菌製造用に区分された製造環境で製造されています。品質保証と品質管理 (ISO 13485:2003および21 CFR Part 820:QSR) により、ロット間の優れた一貫性を保持しています。

個々の製品の特性にあわせて、物理化学的、生物学的、そして機能性に関する試験が実施されています。試験性能に関する広く認められた基準に加えて、Vitrolife社製品の品質に関する手引書に沿った作業手順における社内基準があります。Vitrolife社製品の品質管理プログラムは、培養液の安全性と有効性を保障するのに必要なあらゆる検査を含んでいます。

品質管理システムで使用されている全ての器具ならびに標準液は、認証された製造企業から購入しています。

妥当性の確認と検定

Vitrolife社において実施されている全ての品質管理手順は、ハイレベルな資格のある担当者により品質確認操作 (ISO 13485:2003 and 21 CFR Part 820:QSR) に従って実施されています。使用される全ての方法ならびに器具は、継続的かつ包括的な妥当性の確認と検定プログラムに従ったものです。

物理化学的な検定

pH

pH値の測定はUSPとPh Eurにより妥当性を確認された方法を使って行われています。各製品のpH値の許容範囲は、製品の性質とその使用目的をよく考慮し、可能な限り狭められています。サンプルは測定前に適切な温度と環境下で前もって平衡を行っています。6% CO_2下での培養液の平衡は、CO_2濃度を確認した混合ガスを使って実施しています。

浸透圧

浸透圧の測定は凝固点降下に基づいて認証された方法を使い、USPならびにPh Eurに従って実施されています。各製品の浸透圧の許容範囲は、製品の性質とその使用目的をよく考慮し、可能な限り狭められています。

生物学的検査

バクテリアのエンドトキシン

エンドトキシンの毒性レベルが存在しないことは、全ての原材料ならびに製品の各ロットで確認されています。Vitrolife社において使用されている認証済みのバクテリアによるエンドトキシン検査(LAL アッセー) は、検出限界0.005EUまたはIU/mLで、エンドトキシン検査に使用される現在最も感受性の高い方法です。その認証済みの手順は、USP、Ph Eur、ならびにFDA のガイドラインにもなっ ている「Guideline on validation of the limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices」に従って行われます。

無菌検査 – 膜ろ過

全ての培養液の滅菌はUSPならびにPh Eurに従って、膜ろ過方法によって実施されています。試験期間は培養液が2週間、オイルは3週間です。チオグリコール酸培地あるいは大豆カゼイン分解物培地で培養し、バクテリアならびに真菌の発生が認められないことを確認しています。お客様に製品を安全に利用していただけるように、厳格な無菌確認レベル (SAL) を要件としています。

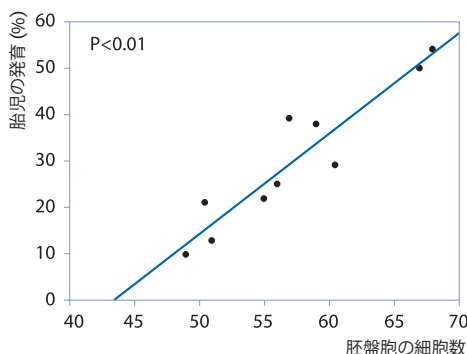
機能性試験

マウス胚による検定

マウス胚による検定 (MEA) は一種の機能性試験です。全ての培養液、培養液の組成ならびに培養液操作に使用される重要な器具は、マウス1細胞期胚を拡張胚盤胞まで培養することにより検定されています。胚の発育時期は各々の検査の特性に応じて、記録されています。培養液の安全性ならびにその効果は、既定の時間内に適切な細胞数を持ち、基準の発育ステージに発育する胚数を観察することによって決定されています。さらに、胚盤胞の細胞数は子宮移植後の胚の生存性に関与していることから、胚盤胞の細胞数を測定すること、またそれぞれの製品に設定されたカットオフ値を使用することにより、MEAの感受性を向上させています。

臨床ART現場で使用する医療器具選定のためのマウス胚による検定の妥当性

米国における生殖医療を行うクリニックを管理統括する米国病理学会 (CAP: College of American Pathologists) によるラボの認証を得るためには、1 細胞期マウス胚による検定 (MEA) といったバイオアッセーが必要とされます。すべての市販の培養液ならびにインハウスで作製されている培養液は、臨床的に使用される前にMEAのようなバイオアッセーによる評価を受けなければなりません[1]。MEAは培養液の組成、培養液ならびにART臨床現場で使用される器具を評価されるために、最も幅広く使用されているアッセーです[2]。MEAは、臨床現場で使用される器具、培養液を覆うために使用される新しいオイルのロット、消耗品、そして新しい培養液のロットなどからの胚に悪影響をもたらす可能性がある毒性の検出に際して、非常に効果的であるということが立証されています。これまで、MEAの感受性を最大限に発揮できるよう様々な工夫がなされてきました。例としては、接触器具を検査する場合、胚毒性のある物質をキレートするアルブミンを含まない培養液を使用しています。さらに、2細胞期胚ではなく、1 細胞期胚を使用します[3]。

MEAにおける胚盤胞の細胞数の測定は胚の生存性の指標となっています。以下の図に示したように、胎児の発育は胚盤胞の細胞数に比例しています[4]。MEAの使用により、ART臨床現場における培養液の製品特性を予測することが可能となります。

参考文献

1. College of American Pathologists (1998) , Reproductive Laboratory-Section 90 Proposed Checklist, p26
2. Gardner DK and Lane M (1999) , Embryo culture systems.Handbook of In Vitro Fertilisation (Second Edition) , Eds.Trounson AO and Gardner DK, CRC Press, Boca Raton p 205-264.
3. Davidson, A., Vermesh, M., Lobo, R.A., and Paulson, RJ (1998) , Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilisation: the one-cell versus the two-cell model.Fertil.Steril., 49:516-521.
4. Lane M. and Gardner DK (1997) , Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids.Reprod Fertil., 109:153-164.

G-Series™とVitrolife社の関連製品

製品名	510 (k) #	使用目的
G-MM™	K021894	G-MM™ヒト組み換えアルブミン (50 mg/mL) を含み、配偶子や胚を取り扱う生殖補助医療で使用することを目的としている。生殖補助医療ではG-MM™は培養液の添加物として使用する。注射用に使用しないこと。
HSA-solution™	K021896	HSA-solution™ はヒト血清アルブミン (100 mg/mL) を含み、配偶子や胚を取り扱う生殖補助医療で使用することを目的としている。生殖補助医療ではHSA-solution™は培養液の添加物として使用する。注射用に使用しないこと。 注意事項:すべての血液製剤は感染性物質として扱うこと。HSAsolution™の原材料には現在のFDAの指針による検査HIV types 1ならびに2、HBV、HCVそしてHTLV types IならびにIIで陰性だったもののみが使用されている。ヒト血液由来製品が感染性物質を含んでいないことを保証できる検査は今のところ無い。
G-IVF™ G-IVF™ PLUS	K081116	配偶子の洗浄、操作、体外受精に使用される培養液
G-1™ G-1™ PLUS	K081114	前核期胚からday 2、3胚までの培養に使用される培養液
G-2™ G-2™ PLUS	K081117	day 3胚から胚盤胞期胚までの培養に使用される培養液
EmbryoGlue®	K031015	胚移植のための培養液
G-MOPS™ G-MOPS™ PLUS	K081115	大気下で卵子や胚を操作する培養液
G-GAMETE™	K021893	大気下で卵子や胚を操作する培養液
G-RINSE™	K022295	使用機材や頸管を洗浄する溶液。培養には使用しない

次ページへ続く

製品名	510 (k) #	使用目的
G-FreezeKit Blast™	K032154	胚盤胞期胚の凍結溶液
G-ThawKit Blast™	K032155	胚盤胞期胚の融解溶液
G-PGD™	K033101	バイオプシーに使用する培養液
SpermGrad™	K023403	精子密度勾配分離に使用する
HYASE™ *	K000627	卵丘細胞の除去に使用する
ICSI™ *	K043116	卵細胞質内精子注入法 (ICSI) で精子の不動化、精子の注入針への吸引に使用する
FREEZEKIT 1™ *	K000623	分割期胚の凍結溶液
THAWKIT 1™ *	K000618	分割期胚の融解溶液
FreezeKit™ Cleave *	†	前核期胚および分割期胚の凍結溶液
ThawKit™ Cleave *	†	前核期胚および分割期胚の融解溶液
OVOIL™	K991351	体外受精ならびに顕微操作で培養液を覆うオイル

その他のVitrolife社製品

IVF™ *	K991348	体外受精、培養、胚移植に使用する
ASP™ *	K991345	採卵、採卵針の洗浄 (卵胞の洗浄) に使用する
SpermRinse™ *	K000621	精子の洗浄に使用する
CCM™ *	**研究用のみ**	day 3胚から胚盤胞期胚までの培養に使用される培養液

* オーストラリアでは使用不可
† 米国では使用不可

G-Series™: 培養液の組成

培養液	抗生物質	MOPS	$NaHCO_3$	アミノ酸	ビタミン	ヒアルロナン
G-RINSE™	ゲンタマイシン	–	Yes	–	–	–
G-MOPS™ / G-MOPS™ PLUS	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	–
G-IVF™ / G-IVF™ PLUS	ゲンタマイシン	–	Yes	非必須アミノ酸	–	–
G-GAMETE™	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	–
G-1™ / G-1™ PLUS	ゲンタマイシン	–	Yes	非必須アミノ酸	–	Yes
G-2™ / G-2™ PLUS	ゲンタマイシン	–	Yes	必須アミノ酸+ 非必須アミノ酸	Yes	Yes
EmbryoGlue®	ゲンタマイシン	–	Yes	必須アミノ酸+ 非必須アミノ酸	Yes	Yes
G-FreezeKit Blast™	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	–
G-ThawKit Blast™	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	–
FreezeKit™ Cleave	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	Yes
ThawKit™ Cleave	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	Yes
G-PGD™	ゲンタマイシン	Yes	Yes	非必須アミノ酸	–	–

Vitrolife社の関連器具

さらに詳しい情報およびご注文につきましてはwww. vitrolife.comをご覧ください。
以下の製品の使用は国際的な規制基準 (National Regulatory Requirements) に従うものとします。

製品名	510 (k) #	使用目的
様々な直径及び長さのフォリクルアスピレーションニードル (シングル・ダブル・ルアー)	K991273	フォリクル・アスピレーション・セットは滅菌された使い捨て器具で、生体から配偶子を回収することを目的としており、特に卵胞内の洗浄、卵子の吸引を目的としています
様々な内径のデニュデーション ピペット	K991700	卵丘細胞除去用ピペットは卵子から卵丘細胞層をはずすことを目的としています
2種類の内径のトランスファーピペット	K991700	トランスファーピペットは卵子、胚そして胚盤胞を移動するため、受精確認に使用します
ICSI ピペットスパイクなし、各種内径・角度・長さ	K991700	ICSI ピペットは卵子細胞質内に 1 個の精子を注入するために使用します
ICSI ピペット ピペットスパイク有り、各種内径・アングル・長さ	K991104	ICSI ピペットは卵子細胞質内に 1 個の精子を注入するために使用します
ホールディングピペット 各外径・アングル・長さ	K991700 K991104	ホールディングピペットはICSIあるいは他の顕微操作の間、陰圧をかけて卵子や胚を固定するために使用します
バイオプシーピペット 各種内径・角度	K022643	バイオプシーピペットは、単離された割球の着床前期胚遺伝子診断を行うための割球を単離するために使用します

製品名	510 (k) #	使用目的
PZDピペット	K991700	PZDピペットは、胚に孵化補助術を施行するための透明帯に穴を開けるために使用します
ハッチングピペット2種類の外径と長さ	K991700	ハッチングピペットは、胚に孵化補助術を施行するための透明帯に穴を開けるために使用します
Microcell 精子測定用チャンバー	--- *研究用*	精子数を数えるために使用する

使用上の注意と警告

製品が濁っている場合は使用しないでください。

無菌状態を維持するために、Vitrolife社は製品を無菌操作で開封、使用することを推奨しています。

培養液のボトルは開封後に保管しないでください。操作終了後、余分な培養液は廃棄します。

体外での操作のみに使用します。注射溶液として使用しないでください。

注意事項：米国連邦法により、本製品は医師または医師の指示のみにより販売されます。

注意事項：すべての血液製剤は感染性物質として扱う必要があります。血液製剤の原材料には、現在のFDAの指針による検査HIV types 1ならびに2、HBV、HCVで陰性だったもののみが使用されています。ヒト血液由来製品が感染性物質を含んでいないことを保証できる検査は今のところありません。

G5 Series™のIVF培養液を含め、IVF培養液の生殖毒性ならびに発育毒性の危険性は未だ十分に検証されておらず、不明です。

その他詳細

本書にはVitrolife社の製品に関する情報の一部が記載されており、Vitrolife社の製品に関する様々な試験ならびに臨床的な検査に関する基礎的な情報の要約だけが記載されています。記載されている情報は医師の指示に代わるものでも、完璧なものでもありません。従って、記載された情報に関しては医師に相談することが大切です。相談を受けた医師は、本書に記載された製品と手順に関してのより詳しい情報を、Vitrolife社、公認代理店や販売業者に要求することをお薦めします。

さらに、本書に記載されている内容は特にヒトへの使用に限定されたもので、健康、適切性、内科領域各種の医療行為に関する情報も含みます。

本取扱説明書に記載されているすべての製品がすべての国で利用できるわけではありません。

より詳細な情報が必要な場合は、Vitrolife社またはVitrolife代理店までご連絡ください。本取扱説明書は作製後、製品使用における情報が変更されることがあります。最新情報が必要な場合は、Vitrolife社のホームページ (www.vitrolife.com) をご参照ください。

Vitrolife社からのVitrolife培養液ならびに器具の購入はVitrolife社のホームページ (www.vitrolife.com) 上で閲覧できる一般販売用規約に従うものとされますが、内容に相違がある場合は一般販売用規約が優先されることをご了承ください。

すべてのIVF培養液ならびに関連器具はヨーロッパのCEマークを取得しています。2つの例外 (CCM™ とStem Cell Cutting Tool) を除くすべての製品も米国での販売許可を取得しています。

本取扱説明書の情報は作製された段階で有効なものです。
最新の情報についてはwww.vitrolife.comをご覧ください。

連絡先

本取扱説明書に関してのお問い合わせはどのような事でも喜んで対応させていただきます。
ご質問、またはより詳しい説明が必要な場合は以下までご連絡ください:

ヨーロッパ、中東、アジア/環太平洋諸国

電話番号: +46-31-721 80 20 サポートライン
ファックス: +46-31-721 80 99
E-mail: support.fertility@vitrolife.com

住所: Vitrolife Sweden AB
Box 9080
SE-400 92 Göteborg
Sweden

ホームページ

http://www.vitrolife.com

アメリカ大陸

電話番号: 866-VITRO US (866-848-7687)
ファックス: 866-VITROFAX (866-848-7632)
E-mail: support.us.fertility@vitrolife.com

住所: Vitrolife Inc.
3601 South Inca Street
Englewood
Colorado 80110
USA

TOGETHER.
ALL THE WAY™

アメリカ大陸
Vitrolife Inc., 3601 South Inca Street
Englewood, Colorado 80110, USA
電話番号： 866-848-7687 (866-VITRO US)
ファックス： 866-848-7632 (866-VITROFAX)

ヨーロッパ、中東、アジア/環太平洋諸国
Vitrolife Sweden AB, Box 9080
SE-400 92 Göteborg, Sweden
電話番号： +46-31-721 80、ファックス： +46-31-721 80 99

E-support アメリカ大陸
support.us.fertility@vitrolife.com

E-support ヨーロッパ、中東、アジア/環太平洋諸国
support.fertility@vitrolife.com

E-mail
fertility@vitrolife.com

ホームページ
http://www.vitrolife.com